THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA
DAVIS

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Zweite Abteilung. 41. Band

CENTRALBLATT
für
Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Zweite Abteilung:

Allgemeine, landwirtschaftlich-technologische Bakteriologie,
Gärungsphysiologie,
Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz

In Verbindung mit

Prof. Dr. Adametz in Wien, Geh. Reg.-Rat Dr. O. Appel, Biologische Anstalt zu Berlin-Dahlem, Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. J. Behrens, Direktor der biologischen Anstalt zu Berlin-Dahlem, Prof. Dr. M. W. Beijerinck in Delft, Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Delbrück in Berlin, Alb. Klöcker, extr. Vorsteher, Carlsberg-Laboratorium in Kopenhagen, Prof. Dr. Lindau in Berlin, Prof. Dr. Lindner in Berlin, Prof. Dr. F. Löhnis in Washington, Prof. Dr. Müller-Thurgau in Wädenswil, Prof. Dr. M. C. Potter, Durham College of Science, New-Castle-upon-Tyne, Prof. Dr. Samuel C. Prescott in Boston, Dr. Rommel in Berlin, Dr. Erwin F. Smith in Washington, D. C., U. S. A., Prof. Dr. Stutzer in Königsberg i. Pr., Prof. van Laer in Gand, Prof. Dr. C. Wehmer in Hannover, Prof. Dr. Weigmann in Kiel und Prof. Dr. Winogradsky in Petersburg

herausgegeben von

Geh. Reg.-Rat
Prof. Dr. Oscar Uhlworm
in Berlin

und

Prof. Dr. F. Löhnis
in Washington D. C.

41. Band

Mit 11 Tafeln und 32 Figuren im Texte

Jena
Verlag von Gustav Fischer
1914

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
COLLEGE OF AGRICULTURE
DAVIS

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. No. 1/8.
Ausgegeben am 27. Mai 1914.

Nachdruck verboten.

Untersuchung über die Bakterienflora einiger Kraftfuttermittel in frischem und gärendem Zustande, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Einwirkung auf Milch.

[Aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratorium der eidg. Technischen Hochschule in Zürich. Vorstand: Prof. Dr. M. Düggeli.]

Von **A. Wigger**, Molkereiinspektor.

Einleitung.

Die Kraftfuttermittel spielen in der Ökonomik unserer fortgeschrittenen Landwirtschaft eine sehr bedeutende Rolle. Aufbauend auf die neuern Theorien einer rationellen Tierernährung, macht sich immer mehr das sehr begrüßenswerte Bestreben geltend, die Rauhfuttermittel, namentlich Heu und Emd, in ihrer Zusammensetzung durch Beifutter in einer für die zweckmäßige Tierernährung vorteilhaften Weise zu ergänzen, und dieser Umstand bedingt nun, daß jedes Jahr große Mengen von Erdnuß- und Sesamkuchen und -mehlen in die Schweiz eingeführt werden. Diese Einfuhr betrug z. B. im Jahre

1907	239 174 q[1]	1910	304 191 q
1908	250 206 q	1911	401 210 q
1909	277 313 q	1912	340 913 q

Der Einfuhrswert pro 1911 wird auf Fr. 7 728 564 und jener von 1912 auf Fr. 6 905 840 angegeben. Noch höhere Werte erreichen die zu Fütterungszwecken verwendeten Müllereiabfälle der Schweiz; denn unser Land produziert jährlich ca. 1 110 000 q Kleie, die einen Wert von Fr. 14 430 000 repräsentiert. — Schon diese wenigen Angaben lassen erkennen, welche Wichtigkeit den Kraftfuttermitteln für die Ernährung unseres Viehstandes, dessen Bestimmung es ist, das ganze Land mit Milch und Fleisch zu versorgen, heutzutage zukommt.

Leider muß nun aber nicht allzu selten die Beobachtung gemacht werden, daß diese nährstoffreichen Beifutter mehr oder weniger verdorben und gesundheitsschädlich sind. In der landwirtschaftlichen Praxis werden hie und da Fälle beobachtet, in denen bei Verabreichung von Kraftfutter an den Nutztieren Krankheitserscheinungen auftreten, oder nur widerwillige Annahme, beziehungsweise direkte Verweigerung äußerlich ganz normal aussehender Futtermittel stattfindet. Um die Ursachen dieser unangenehmen Erscheinung kennen zu lernen, wurden in solchen Fällen die fehlerhaften Kraftfuttermittel einer eingehenden chemischen Untersuchung unterzogen, ohne daß es aber gelungen wäre, bis anhin den gewünschten Aufschluß — in den meisten Fällen wenigstens — zu erhalten.

Nach den Ergebnissen der chemischen Analyse sind die Beifutter reich an Nährstoffen, die den Bakterien gut zusagen, und bergen gleichzeitig, wie wir uns durch eine einfache Prüfung leicht überzeugen können, ganz bedeutende Quantitäten von Spaltpilzen. Der einzige Faktor, welcher unter den Verhältnissen der landwirtschaftlichen Praxis zur kräftigen Vermehrung der Mikroorganismen in diesen Futterstoffen fehlt, ist das Wasser. Sobald die notwendige Feuchtigkeit zutreten kann, sei es infolge feuchter Lagerung, direkter Anfeuchtung vor der Verfütterung oder durch irgendwelche andere Umstände, so vermehren sich die Mikroorganismen, und ihre Umsetzungsprodukte sind dann wohl in der Lage die Güte und Bekömmlichkeit des betreffenden Kraftfutters nachteilig zu beeinflussen. Es wird uns deshalb nicht wundern, daß in Fällen, wo qualitativ minderwertige Futterstoffe in ihrem chemischen Untersuchungsresultat nicht oder kaum zu beanstanden waren, auf Grund der bakteriologischen Prüfung als abnormal bezeichnet werden konnten. Es ist offenbar der bakteriologischen Forschung in manchen der in Frage stehenden Fällen vorbehalten, Licht in das bisher noch vorhandene Dunkel zu bringen. — Um mikrobiologisch abnormal zusammengesetzte Futtermittel erkennen zu können, ergibt sich in erster Linie die Notwendigkeit, die Mikroflora der entsprechenden normalen Futterstoffe kennen zu lernen. Durch Zugabe kleiner Quantitäten sterilen Wassers und Aufstellen der befeuchteten Probe bei geeignet erscheinenden Temperaturen sind wir in der Lage, die Entwicklung der Mikroflora in angefeuchteten Futtermitteln zu studieren.

---

[1] Die Zahlen wurden von der Preisberichtstelle in Brugg in freundlicher Weise übermittelt.

In Anbetracht nun, daß dieses Gebiet der bakteriologischen Forschung über Kraftfuttermittel noch sehr bedeutend im Rückstande ist, ja vielfach einer verläßlichen Grundlage gänzlich entbehrt, machte mir mein verehrter Lehrer und Chef, Herr Prof. Dr. M. Düggeli, den Vorschlag, nach dieser Richtung eingehendere Untersuchungen vorzunehmen. Sowohl vom wissenschaftlichen, wie auch vom molkereitechnischen Standpunkt aus erschien es uns aber auch wünschenswert, gleichzeitig das noch völlig brachliegende Gebiet der Beeinflussung der Milch durch zufällig hineingelangende, kleine Quantitäten frischer oder in Gärung begriffener Kraftfuttermittel zum Gegenstand eingehender Untersuchungen zu machen. Jedem, der Stallinspektionen vorzunehmen hat, sind die zahlreichen Möglichkeiten, speziell in den kleineren bäuerlichen Betrieben bekannt, durch welche die Bakterien der Kraftfuttermittel durch Verstäuben von trockenem und Verschleppen von angefeuchtetem Material, ev. auch noch nach Passieren des Verdauungstraktus in die Milch gelangen und dort sich unter Umständen stark vermehren können. Dadurch wird die Mikroflora der Konsum- und Käsereimilch in bestimmter Art und Weise beeinflußt. Dieser Einfluß kann sich sowohl in bezug auf das Wohlbefinden des Konsumenten, speziell dann, wenn die Milch als Kindernahrung zur Verwendung kommt, als auch für die Zubereitung von Molkereiprodukten unter Umständen recht unangenehm bemerkbar machen.

Ursprünglich war vorgesehen, alle die wichtigsten Kraftfuttermittel in den Kreis der Untersuchung einzubeziehen. Allein es erwies sich schon im Verlaufe der Vorversuche, daß eine allseitig gründlichere Untersuchung auf so breiter Basis den Abschluß der Arbeit auf unabsehbare Zeit verschieben müßte, und so wählten wir schließlich nur drei, in der Schweiz besonders häufig verwendete Kraftfuttermittel zum Gegenstand unserer Untersuchungen, nämlich Kleie, Erdnußkuchen und -mehle und Sesamkuchen und -mehle. Trotz dieser Einschränkung mußte noch eine ganze Reihe interessanter Fragen offen gelassen werden, um den Abschluß der Arbeit nicht zu sehr zu verzögern. Die Arbeit setzt sich zusammen aus einem allgemeinen und einem speziellen Teile. Der allgemeine Teil schließt die Darstellung der zur Anwendung gekommenen Untersuchungstechnik in sich. Der spezielle Teil umfaßt 3 analog bearbeitete Kapitel, nämlich:

I. Bakteriologische Untersuchung von Kleie verschiedener Herkunft.
II. Bakteriologische Untersuchung von Erdnußmehlen und Erdnußkuchen.
III. Bakteriologische Untersuchung von Sesammehlen und Sesamkuchen.

I. Teil.

Untersuchungstechnik.

Im nachfolgenden geben wir in gedrängter Kürze die Beschreibung der bei der ganzen Durchführung der Arbeit zur Anwendung gekommenen Untersuchungstechnik. Um Wiederholungen im speziellen Teile tunlichst zu vermeiden, muß an dieser Stelle besonders darauf hingewiesen werden, daß die hier beschriebene Arbeitsmethode bis zum Schlusse der Arbeit in unveränderter Form zur Anwendung kam.

1. Die Herstellung der für die Untersuchungen verwendeten Nährböden.

a) Gelatine-Nährböden.

α) Gewöhnliche Gelatine (Fleischwasserpepton-Gelatine oder Nährgelatine): Da die Bereitung dieses, in der Bakteriologie sehr häufig verwendeten Nährbodens als allgemein bekannt vorausgesetzt werden darf, kann hier von der Beschreibung des Herstellungsverfahrens abgesehen werden. Erwähnt sei nur, daß zur Gewinnung des Fleischwassers stets fein gehacktes möglichst fettfreies Ochsenfleisch als Ausgangsmaterial diente. Diesem wurde je nach der Jahreszeit, 10—13 Proz. Gelatine nebst Pepton und Kochsalz zugesetzt. Als Indikator für die Neutralisierung mit Kalilauge diente Curcumapapier.

β) Molken-Gelatine: Die bei der Herstellung dieses Nährbodens zur Verwendung kommende Molke wird in Anlehnung an das Verfahren, wie es bei der Emmentalerkäsefabrikation Anwendung findet, gewonnen. Zu frischer, auf 30—35° C erwärmter Magermilch werden pro Liter 10—12 Tropfen Labextrakt von der Stärke 1 : 10 000 zugesetzt, wodurch sich das Kaseïn, wenn man für Beibehaltung einer möglichst gleichbleibenden Temperatur sorgt, in etwa ½—¾ Stunde gallertig ausscheidet. Die nun folgende Erwärmung des in erbsengroße Stücke zerschnittenen Koagulums auf 55—60° C bewirkt, daß sich das Gerinnsel zusammenzieht und eine klare, gut verwendbare Sirte oder Molke erhalten wird. Diese Molke wird dann im Autoklaven bei ca. ½ Atmosphäre Überdruck in ¾ Stunden sterilisiert und vor dem Gebrauch mit ungefähr gleicher Menge Leitungswasser verdünnt. Die Herstellung der Molken-Gelatine selbst aus der auf diese Weise erhaltenen Flüssigkeit geschieht ganz analog der Bereitung von gewöhnlicher Gelatine. Nur wird statt des Fleischwassers Molke verwendet und der Kochsalzzusatz weggelassen.

γ) Peptonschotten-Gelatine: Dieser Nährboden unterscheidet sich von der Molken-Gelatine dadurch, daß man bei dessen Herstellung, wie schon der Name andeutet, statt der Molke sog. Schotte verwendet. Darunter verstehen wir eine von dem Albumin (Ziegerstoff) befreite Molke. Die nach oben beschriebenem Verfahren gewonnene, unverdünnte Sirte wird unter Milchsäurezusatz auf 80—90° C erhitzt, wodurch sich das Albumin in feinflockiger Form ausscheidet. Die filtrierte Flüssigkeit, die Schotte, wird nun ganz analog wie die Molke, sterilisiert und das weitere Verfahren bei der Herstellung der für unsere Bakterienkulturen verwendeten Peptonschotten-Gelatine gestaltete sich ganz gleich, wie die Bereitung der Molkengelatine.

b) Agar-Nährböden.

α) Gewöhnlicher Agar (Fleischwasser-Pepton-Agar oder Nähr-Agar): Dieser Nährboden wurde auf die allgemein übliche Weise unter Verwendung von Ochsenfleisch hergestellt. Es wurden pro Liter Fleischwasser 15 g Agar-Agar verwendet. Die Neutralisierung erfolgte mittels Kalilauge, wobei Curcumapapier als Indikator diente.

β) Milchzucker-Agar: Herstellung wie gewöhnlicher Agar, jedoch unter Beigabe von 20 g Milchzucker pro Liter Nährflüssigkeit.

γ) Traubenzucker-Agar: Herstellung wie gewöhnlicher Agar, jedoch unter Beigabe von 20 g Traubenzucker auf 1 l Fleischwasser.

δ) Peptonschotten-Agar: Die Herstellung dieses Nährbodens erfolgte analog wie bei gewöhnlichem Agar. Es wurde aber statt Fleischwasser Schotte verwendet und Pepton beigegeben.

Bei unseren Versuchen kamen nun alle die genannten Nährböden, nämlich je drei als Gelatine-Plattenkulturen, vier als Agar-Plattenkulturen und drei als hohe Schichtkulturen nach Burri, alle wieder in der nötigen Anzahl von Verdünnungen, zur Verwendung. Dadurch hatten wir Gelegenheit, uns zu überzeugen, welche derselben für frisches und welche für gärendes Material in den verschiedenen Stadien sich am besten eignen; mit anderen Worten, auf welchen Nährböden voraussichtlich die Entwicklung der größten Anzahl von Keimen zu erwarten sei. Nachdem uns dieses in befriedigender Weise gelungen war, beschränkten wir uns dann bei den eigentlichen Untersuchungen in der Regel auf die Verwendung je nur einer, nämlich der sich am geeignetsten erwiesenen Art des Nährbodens für Herstellung von Gelatine- und Agarplatten, sowie zur Anlegung von hoher Schichtkultur. Nur in zweifelhaften Fällen kamen je mehrere Nährböden der gleichen Gruppe zur Benutzung (Parallelkulturen).

2. Verfahren bei der qualitativen und quantitativen Bestimmung der in den Kraftfuttermitteln vorkommenden Spaltpilze.

Da die zur Untersuchung eingelangten Kraftfuttermittelproben, die aus den verschiedenen Gegenden der Schweiz von Genossenschaften, Händlern und Privaten bezogen wurden, ziemlich unregelmäßig zerstreut einliefen, so war es nicht immer möglich, jede Probe sofort nach der Ankunft im Laboratorium zu verarbeiten. Wir brachten daher alles Material, das wir kürzere oder längere Zeit aufzubewahren genötigt waren, in große, mit Alkohol ausgespülte und nachher gut ausgetrocknete Erlenmeyerkolben, die mit einem Wattepfropfen leicht verschlossen wurden. Alle Proben wurden in einem mäßig trockenen Zimmer, bei ziemlich konstanter Temperatur aufbewahrt. Die Anlegung der Kulturen aus frischem Material vollzog sich, kurz zusammengefaßt, wie folgt:

2 g des gut durchmischten Materials wurden abgewogen und unter Beobachtung steriler Kautelen in Wasser fein zerrieben. Bei Kuchen fand vorerst eine entsprechende Zerkleinerung statt. Wir verwendeten stets 2 g des zu untersuchenden Materials, um ein verläßlicheres Durchschnittsresultat zu erhalten und um auf diese Weise Zufälligkeiten, die das Untersuchungsergebnis bei Verwendung eines kleineren Quantums in bedeutend höherem Maße beeinflussen können, wie z. B. ungleiche Beschaffenheit des Materials, lokale Bakterienansammlungen, Fehlergrenzen bei Wägungen und Messungen usw. nach Möglichkeit auszuschalten.

Von dem fein zerriebenen Material wurden in üblicher Weise Verdünnungen hergestellt. Bei frischen Kraftfuttermitteln bewährten sich in der Regel Verdünnungen von $^1/_{1000}$, $^1/_{10\,000}$, $^1/_{100\,000}$ und $^1/_{1000\,000}$ g der Probe. Mit diesen dezimalen Keimzahleinheiten wurden Plattenkulturen bzw. hohe Schichtkulturen nach Burri angelegt und bei drei verschiedenen Temperaturen aufbewahrt. Die Gelatineplatten wurden zu 18—20, die Agarplatten zu 30 und die hohen Schichtkulturen zu 37° C gestellt.

Nachdem sich die einzelnen Spaltpilzarten in den Kulturmedien genügend entwickelt hatten, was in der Regel nach 6—8 Tagen der Fall war, wurde mittels einer in Quadratzentimeter eingeteilten Zählplatte jeweils eine Zählung vorgenommen und zwar derart, daß auf jeder der vier in dezimalen Abstufungen hergestellten Verdünnungen die Anzahl der gewachsenen Kolonien abgezählt und jeweils jene Plattenkultur für die endgültige Festsetzung der Keimzahl als ausschlaggebend anerkannt wurde, in der ungefähr 30—200 Kolonien zur Entwicklung gelangt waren. Auf empirischem Wege hatten wir die Überzeugung gewonnen, daß fast regelmäßig jene Kulturplatten oder hohen Schichten, die oben genannte Kolonienzahl aufwiesen, am besten dem wirklichen Keimgehalte des zur Untersuchung gekommenen Materials entsprachen. Auf zu dicht besetzten Platten wurde meist nur eine summarische Zählung vorgenommen, in der Weise, daß die Kolonien mittels einer guten Lupe in 8—10 auf verschiedene Partien der Platte verteilten Feldern von 1 qcm Fläche abgezählt, aus der Summe das arithmetische Mittel gesucht und dieses mit 64 multipliziert wurde; denn auf unseren Petrischalen beträgt die mit Nährboden bedeckte Fläche 64 qcm. Das erhaltene Resultat mußte natürlich noch mit der auf der Platte vorgemerkten Verdünnungszahl multipliziert werden. So erhielten wir den Bakteriengehalt pro Gramm des betreffenden Kraftfuttermittels.

Die Tatsache, daß jeweils Kulturen mit 30—200 Kolonien am zuverlässigsten für die Keimzahlbestimmung sich erwiesen, läßt sich unschwer erklären; denn bei einer dichteren Besetzung der sich stets gleichbleibenden Nährbodenfläche kommen leicht manche Arten, die im Material möglicherweise noch ziemlich zahlreich vorhanden sein können, infolge der antagonistischen Wirkung anderer Spezies nur sehr spärlich, oft auch gar nicht zur Entwicklung, während im Gegenteil in einer zu dünn besetzten Kultur, wo sich beispielsweise nur 10—15 Kolonien vorfinden, der Zufall eine allzu große Rolle spielt. Im letzteren Falle kann eben jede einzelne Kolonie die zu suchende Keimzahl um 10—20 und mehr Prozent verändern. Von dem vielen bezüglichen Beweismaterial hier nur eine einzige Stichprobe:

Gewöhnlicher Agar wurde mit verschiedenen, in dezimalen Zahlen abgestuften Quantitäten frischer Kleie beschickt. Es wurden Plattenkulturen von $^1/_{10}$, $^1/_{100}$, $^1/_{1000}$ und $^1/_{10\,000}$ g Impfmenge hergestellt; die Platten kamen zu 30° C. Nach 4 Tagen waren entwickelt:

Auf	Platte	a	mit	$^1/_{10}$ g	geimpft	= ca.	2700	Kolonien;	wirkl.	Gehalt	= 27 000	Keime.
„	„	b	„	$^1/_{100}$ g	„	= „	364	„	„	„	= 36 400	„
„	„	c	„	$^1/_{1000}$ g	„	= „	38	„	„	„	= **38 000**	„
„	„	d	„	$^1/_{10000}$ g	„	= „	5	„	„	„	= 50 000	„

Im vorliegenden Falle wird der Keimgehalt, der durch Platte c ausgewiesen wird, also 38 000 pro g angenommen werden müssen, da diese Zahl zweifellos mit der Wirklichkeit am besten übereinstimmt. Wollten wir z. B. das auf Platte d erhaltene Resultat von 50 000 annehmen, so würde die Keimzahl fast um ⅓ größer, ein Resultat, das in bezug auf annähernde Richtigkeit sehr in Frage gestellt werden müßte; denn auf Platte d beeinflußt ein einzelner, vielleicht ganz zufällig zu viel oder zu wenig in das Nährmedium übertragener oder aus der Luft hereingefallener Keim das Zählresultat um $^1/_5$—$^1/_4$, also um 20—25 Proz., auf Platte c aber nur um 2,6—2,7 Proz. Platte c und allenfalls auch b sind also in unserem Falle maßgebend. a weist entschieden zu niedrige Keimzahlen auf, weil bei der zu starken Besetzung viele Keime in der Entwicklung gehemmt worden sind.

Die Untersuchung der hohen Schicht geschah bei allen Proben immer in der Weise, daß vorerst auf das Vorhandensein von Anaëroben geprüft wurde. Dann ließen wir den mit Kolonien besetzten, gesamten Agarzylinder aus der Burrischen Röhre in eine sterile Petrischale gleiten, beseitigten das Kondenswasser mittels Fließpapier, zerschnitten den Agar mit sterilem Messer, zählten und untersuchten die Kolonien. An diesen beiden hier beschriebenen Verfahren der Zahlbestimmung auf Platten und in hoher Schicht wurde konsequent während der ganzen Dauer der Arbeit festgehalten.

Der quantitativen Untersuchung der Kulturen folgte stets auch eine qualitative Bestimmung, d. h. die für die Zählung maßgebenden Platten und hohen Schichten wurden, soweit möglich, auch auf die einzelnen vorkommenden Bakterienspezies geprüft. Dabei wurde so verfahren, daß alle Kolonien als zu identischen Arten gehörend angesehen wurden, sobald sie im Wachstum auf den betreffenden Nährböden und im mikroskopischen Bild genau übereinstimmten. In zweifelhaften Fällen wurde vorerst eine Agarstrich- oder eine Milchzuckeragarstrichkultur hergestellt. Nun mußte das Vorhandensein einer wirklichen Reinkultur nachgewiesen werden und zu diesem Zwecke erfolgte die Anlegung von Plattenkulturen aus der Stammkultur. Von den Plattenkulturen wurde dann eine größere Anzahl von Nährböden, in der Regel folgende, beschickt: Gelatine- und Agarplattenkulturen, Gelatinestrich, Agarstriche, die bei 30 und 37° C aufbewahrt wurden, ferner Traubenzuckeragar- oder Milchzuckeragar-Schüttelkulturen, gewöhnliche Bouillon, Kartoffel und Milch. Nicht selten mußten auch noch andere Hilfsmittel herangezogen werden, wie z. B. Gasbestimmungen, Säurebestimmungen, Verhalten auf Spezialnährböden usw. Die öfteren und fortgesetzten Beobachtungen und Vergleichungen führten uns meist nach etwa 10—12 Tagen zur Entscheidung, ob die so geprüften Arten identisch seien oder nicht. Jetzt wurde, falls sich die betreffende Spezies nicht als unzweifelhaft übereinstimmend mit einer uns schon bekannten Art auswies, an Hand der angelegten eingehenden Aufzeichnungen und Charakterisierung der fraglichen Art ein Vergleich mit der in der Literatur enthaltenen Angaben durchgeführt und erst dann auf Grund genügender Übereinstimmung die Identität ausgesprochen.

Freilich war es oft schwierig genug hierin eine sichere Entscheidung zu treffen, da bei einzelnen Spezies die bunteste Durchmischung der innerhalb der Variabilitätsgrenze möglichen Abweichungen vorkamen. Die diesbezüglichen Erfahrungen bestätigten voll und ganz die schon von Düggeli[1]) gemachten Angaben. Ja in vielen Fällen mußten die Schwankungen noch als bedeutend größer bezeichnet werden. Diese große Variationsbreite ließ sich bei verschiedenen Gruppen der in den Futtermitteln vorkommenden Bakterien feststellen.

---

[1]) Speziesbegriff der Bakterien. (Verhandl. d. schweizer. naturforsch. Gesellsch. an d. Jahresversamml. in Luzern 1905.)

Die bedeutenden Schwankungen sowohl in morphologischer als auch in physiologischer Beziehung erschienen uns leicht erklärlich, wenn wir bedenken, was für verschiedenen Lebensbedingungen und wechselnden Einflüssen die in unseren gewöhnlichen Kraftfuttermitteln enthaltenen Mikroorganismen ausgesetzt sind. Da ist z. B. auf einer Kleie, die von einem ungarischen, russischen, amerikanischen oder gar australischen Getreide stammt, eine Bakterienart angesiedelt, die aus fernen Landen kommt, und sich vielleicht durch Tausende von Generationen hindurch ganz spezifischen Lebensbedingungen angepaßt hat und daher auch nach einer bestimmten Richtung, entsprechend eben den dortigen Verhältnissen innerhalb den gegebenen Möglichkeiten sich entwickelt und verändert hat, während vielleicht die gleiche Art — und solche Ubiquisten gibt es unter den Bakterien — auf einheimischem Getreide gewachsen, möglicherweise sehr stark abweichende Lebensbedingungen vorfand und daher gezwungen wurde, eine Variation nach einer anderen Richtung einzuschlagen. Solche Divergenzen lassen sich auch bei künstlicher Züchtung leicht einleiten. Unterschiede in Temperatur und Feuchtigkeit, in Lichteinwirkung, Nahrungsverhältnissen, Dauer des latenten Lebensstadiums usw. haben hier allem Anschein nach einen ganz bedeutenden Einfluß. Es können dadurch ehemals für eine Art typische Eigenschaften, wie z. B. Gasbildung, Peptonisierungsvermögen, Farbstoffproduktion, Größe und Form der Zellen usw., ganz wesentlich beeinflußt werden. In solchen Fällen ist es um so schwieriger, eine Artdiagnose mit Sicherheit aufzustellen, je mannigfaltiger die Bedingungen sind, unter denen die einzelnen Varianten der betreffenden Art früher sich entwickelt haben, und dieser Umstand machte sich gerade bei der Untersuchung der Kraftfuttermittel auf eine, die Arbeit oft sehr erschwerende Art und Weise unangenehm fühlbar. Die in den Bereich unserer Untersuchungen einbezogenen Proben, sowohl Kleie als auch Sesam- und Erdnußabfälle, stammten nämlich aus verschiedenen Gegenden. Ja bei indirektem Bezuge, auf den wir in den allermeisten Fällen angewiesen waren, konnte die Herkunft des Untersuchungsmaterials gar nicht ermittelt werden.

Eine ungemein große Variabilität konnten wir vor allem bei den gasbildenden Milchsäurebakterien, der Coli-aërogenes-Gruppe feststellen, wo Übergangsformen vom typisch ausgeprägten Bact. coli nach und nach in allen erdenklichen Zwischenstufen zur Acidi lactici-Gruppe und von dieser in ebenso mannigfacher Weise zum charakteristischen Bact. aërogenes überführten. Die beiden Endglieder dieser Reihe, also ausgeprägte Coli- oder Aërogenes-Typen, waren jedoch verhältnismäßig selten; in wohl 80—90 Proz. der Fälle mußte die Art nach dem Vorschlage von Burri und Düggeli[1]) als dem Bacterium acidi lactici (Hüppe) zugehörend entschieden werden, und wir hatten in einer Sammlung von über 100 verschiedenen acidi lactici-Stämmen aus frischen und gärenden Futtermitteln ein wahres Mosaik von Eigenschaften vertreten. Leider konnten wir nicht, wie dies ursprünglich beabsichtigt war, auch auf die Fragen der Variabilität selbst eingehen, die uns unter Anwendung des von Burri erfundenen Tuscheverfahrens[2]) eine ebenso dankbare als interessante Frage zu sein schien.

---

[1]) Beiträge zur Systematik der Coli-aërogenes-Gruppe nebst Beschreibung einer neuen Methode zur Untersuchung der Gärungsgase. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909. p. 145—174.)

[2]) Burri, Robert, Das Tuscheverfahren als einfaches Mittel zur Lösung einiger schwieriger Aufgaben der Bakterioskopie. Jena 1910.

Was die quantitative Bestimmung der einzelnen Arten auf den zur genaueren Analyse herbeigezogenen Kulturen anbetrifft, so wurde immer die Menge auf jenem Nährboden, auf dem die meisten Kolonien der betreffenden Spezies zur Entwicklung gelangt waren, als maßgebend angenommen. Es wurden also stets die Maximalzahlen der Spezies zusammengestellt. Falls schon auf den ersten Blick erkenntlich war, daß eine bestimmte Art auf dem einen der drei verschiedenen Nährböden (Gelatine- und Agarplatten und hohe Schicht) in bedeutend kleinerer Zahl, als auf den beiden anderen vorhanden war, so wurde diese Art auf dem betreffenden Nährboden gar nicht gezählt, sondern es wurde nur die größere Zahl auf dem anderen Nährboden berücksichtigt (maximale Vertretung). Doch wurde das Vorhandensein in untergeordneter Zahl oft durch ein Kreuz angedeutet, während das gänzliche Fehlen durch einen wagerechten Strich angemerkt wurde. Nachfolgend zwei Beispiele:

a) Erdnußkuchen J, frisch pro g.

Bezeichnung der Arten	Gelatine-platten	Agar-platten	Hohe Schicht	Maximal-zahl	% d. Gesamtz.
Bact. acidi lactici	**220 000**	150 000	+	220 000	29
Gelber Gasbildner	**70 000**	60 000	+	70 000	10
Gelber Säurebildner	**50 000**	+	—	50 000	7
Bact. Güntheri	18 000	20 000	**300 000**	300 000	40
Bacillus mesentericus	**10 000**	10 000	—	10 000	1
Bacillus megatherium	**10 000**	+	—	10 000	1
Schlanke sporenbild. Stäbchen (nicht näher verfolgt) . . .	**60 000**	20 000	+	60 000	8
Kokken	**30 000**	10 000	—	30 000	4
Gesamtzahl				750 000	100

b) Milch Vb (Konsummilch mit Sesammehl geimpft) pro ccm.

Art	Gelatine-platten	Agar-platten	Hohe Schicht	Maximal-zahl	% d. Gesamt-zahl
Bact. fluorescens	200 Mill.	100 Mill.	—	200 Mill.	4
Bacterium coli	100 „	—	—	100 „	2
Bact. acidi lactici	30 „	80 „	+	80 „	2
Gelber Gasbildner	40 „	50 „	—	50 „	1
Bact. Güntheri	600 „	900 „	4200 Mill.	4200 „	91
Sarcina (nicht näher verfolgt)	10 „	—	—	10 „	—
Gesamtzahl				4640 Mill.	100

Die Berechnung nach Prozenten geschah immer in auf- oder abgerundeten Zahlen; es handelt sich hier also nur um Annäherungswerte1).

Was uns an diesen beiden Beispielen hauptsächlich auffällt, ist das ungleichmäßige Wachstum der einzelnen Arten auf den verschiedenen Nährböden. Während z. B. bei a das Bact. acidi lactici auf Gelatine 220000 Kolonien aufwies, waren auf Agarplatten nur deren 150000, also um ⅓ weniger. Offenbar handelt es sich hier um eine Anpassung dieses Gasbildnerstammes an niedere Temperatur; daneben kann auch der Nährboden selbst

---

1) Arten, die nicht 1 % der Gesamtflora ausmachten, wurden gewöhnlich nicht berücksichtigt, wenn nicht besondere Gründe dafür sprachen.

von Einfluß sein. Noch viel ausgesprochener zeigt sich die Erscheinung des ungleichmäßigen Wachstums bei Bacterium Güntheri, das sein maximales Wachstum in hoher Schicht aufwies.

Diese beiden hier als Beispiele angeführten Untersuchungsresultate sollen aber an dieser Stelle nicht bloß das Verfahren, das wir bei der Ermittlung der qualitativen Vertretung der Arten sowie der Gesamtkeimzahl eingeschlagen haben, klarlegen, sondern wir möchten schon jetzt nachdrücklich darauf hinweisen, wie notwendig es ist, bei bakteriologischen Untersuchungen mehrere Nährböden zu beschicken und verschiedene Züchtungstemperaturen und Kulturarten zu wählen. Hätten wir beispielsweise bei dem oben angeführten Versuch a nur Gelatineplatten angelegt und auf Grund der Mikroflora dieses einen Nährbodens allein einer quantitativen und qualitativen Untersuchung als Genüge geleistet, betrachtet, so wäre das größte Kontingent der typischen Milchsäurebakterien, das 40 Proz. der Gesamtflora ausmacht, nicht einmal mit 4 Proz. eingerechnet worden; dafür treten dann aber andere Spezies ungebührlich in den Vordergrund; wieder andere, z. B. solche, die auf dem einen oder anderen Nährboden gar nicht wachsen, bleiben ganz unberücksichtigt. Diese Erfahrung konnten wir im Verlaufe unserer Untersuchungen tagtäglich immer und immer wieder machen. Damit ist zur Evidenz bewiesen, wie unumgänglich notwendig es ist, bei bakteriologischen Analysen, die irgendwie auf Vollständigkeit und Zuverlässigkeit Anspruch machen wollen, wenigstens drei Nährböden: Gelatine- und Agarplatten und hohe Schicht zu beschicken. Auf den Gelatineplatten werden besonders jene luftliebenden Mikroorganismen in größter Zahl sich entwickeln, deren Wachstumsoptimum unter 30° C liegt. Dann gibt es aber auch, ganz abgesehen davon, daß die Kulturen auf Gelatineplatten zur Erkennung und Charakterisierung einer großen Zahl von Arten ganz vorzügliche diagnostische Dienste leisten (typische Koloniencharaktere, Peptonisierungsmöglichkeit, ausgeprägte morphologische Merkmale der Zellen usw.), eine größere Anzahl von Spezies, die überhaupt nur auf Gelatine zur Entwicklung gelangen. Aber auch Agarplatten sind bei einer erschöpfenden Bestimmung der Flora eines Untersuchungsmaterials nicht zu umgehen. Hier werden vor allem jene luftliebenden Spezies zu quantitativ maximalem Wachstum angeregt, die um 30° C herum die ihnen am besten zusagende Temperatur aufweisen. Sodann gibt es, ähnlich wie dies bei Gelatineplatten der Fall ist, bestimmte Arten, die sich nur auf Agarplatten entwickeln und andere, die sich gerade hier durch wertvolle diagnostische Merkmale ausweisen und also sehr leicht zu erkennen sind. Schließlich ist hier die beschränkte Aufbewahrungsmöglichkeit der geimpften Platten, die sich leider in manchen Fällen bei den Gelatinekulturen in sehr unangenehmer und das Untersuchungsresultat wesentlich beeinträchtigender Weise bemerkbar macht, viel weniger zu befürchten. Falls nämlich im Impfmaterial viele peptonisierende Keime vorhanden sind, welche bei den Gelatineplatten infolge rasch fortschreitender Verflüssigung zur Vornahme einer Untersuchung zwingen, bevor eine vielleicht überwiegend große Zahl langsam sich entwickelnder, aber allenfalls für das Untersuchungsergebnis sehr wichtiger Bakterien überhaupt zum Vorschein zu kommen vermochten, können in den meisten Fällen die Agarplatten sehr vorteilhaft in die Lücke treten. — Die hohe Schicht endlich ist überall da unumgänglich notwendig, wo es sich um die Ermittlung von anaëroben Keimen handelt. Sie leistet aber auch in manchen anderen Fällen, so beim Nachweis von Gasbildnern, sehr wertvolle Dienste.

Nach dem Gesagten erscheint uns die von vereinzelten Bakteriologen auch heute noch geteilte Ansicht, daß es auch für eine eingehende Untersuchung genüge, von irgendeinem zu untersuchenden Material nur Gelatineplatten anzulegen, nichts weniger als einwandfrei. Ausgenommen davon sind, das muß hier hervorgehoben werden, alle jene Fälle, wo es sich um die Isolierung oder um den Nachweis einer ganz bestimmten Art handelt, deren Wachstum auf dem einen oder anderen Nährboden schon zum voraus sicher ist.

3. Allgemeines über die Untersuchung von gärenden Futtermitteln und der mit diesen geimpften Milchproben.

a) Methode der Gewinnung und Verarbeitung gärender Futtermittel.

Sowohl Kleie als auch Erdnuß- und Sesamkuchen und -mehle wurden in angefeuchtetem Zustande in verschiedenen Gärstadien untersucht und auch hinsichtlich ihrer jeweiligen Wirkung auf frische und auf keimfreie Milch geprüft. Die Untersuchungen gestalteten sich im allgemeinen wie folgt: Eine bestimmte Menge des frischen, trockenen, gut durchmischten Materials, meistens 40 g[1]), wurde in einem durch Ausflammen sterilisierten Becherglas abgewogen, dann mit einer in allen Versuchsreihen ein und desselben Futtermittels sich stets gleichbleibenden, nämlich der doppelten Gewichtsmenge, sterilen Wassers befeuchtet. Die Masse wurde darauf gut durchmischt und eine bestimmte Zeit zugedeckt bei gewisser Temperatur in Gärung belassen. Dabei wurde die gleiche, auf die eben genannte Weise hergestellte Probe nie mehr als einmal als Untersuchungs- oder Impfmaterial benutzt; sondern es wurden immer gleichzeitig so viele, ursprünglich absolut identische Proben angesetzt, daß jede derselben bis zum Zeitpunkt, wo sie zu Impfzwecken verwendet werden sollte, unberührt bleiben und nach einmaligem Gebrauch beseitigt werden konnte. Wir wählten dieses Verfahren, um die Versuche an die Praxis anzulehnen, wo bei der Viehfütterung sehr oft Reste von verabreichten angefeuchteten Kraftfuttermitteln in der Krippe oder in Gefäßen kürzere oder längere Zeit ruhig in Gärung verbleiben und dann später allenfalls als Infektionsquellen bei der Milchgewinnung in Betracht kommen können.

Da wir bei den ganz eingehenden Untersuchungsfällen in der Regel drei verschiedene Zeiträume als Gärdauer, nämlich 1, 2 und 5 Tage und zwei differente Aufbewahrungstemperaturen, 22 und 37° C, für die benetzten Proben wählten, mußten wir demnach bei jedem ausführlichen Versuche sechs Bechergläser mit je 40 g vom gleichen Material beschicken. Drei der angesetzten Proben wurden in einem Thermostaten bei 37° C aufgestellt; die anderen drei kamen zu 22° C. Nach 1, 2 resp. 5 Tagen kam je eine der bei den genannten Temperaturen in Gärung belassenen Proben quantitativ und qualitativ zur Untersuchung.

Zwei Beispiele mögen den Gang der eingehenden Untersuchung kurz erläutern:

A. Grobe Kleie: Nach Angabe der Herkunft, des Aussehens und der Qualität und nach Untersuchung des frischen Materials wurden angelegt;

---

[1]) Diese, den wirklichen Bedarf weit übersteigende Menge wurde gewählt, um im Aufbewahrungsgefäß eine für die Entwicklung allfällig vorhandener anaërober Keime genügend hohe Schichte des Gärmaterials zu erhalten, weil auf diese Weise in den unteren Partien ein besserer Luftabschluß erzielt wurde.

3. März 1910: 6 Proben zu je 40 g wurden in tarierte, ausgeflammte Bechergläser mittels Präzisionswage abgewogen, mit zirka dem doppelten Gewicht sterilen Wassers angefeuchtet und benannt:

Kleie I a	=	angefeuchtetes Material	24 Std. bei	22° C
Kleie I b	=	„ „	48 Std. bei	
Kleie I c	=	„ „	5 Tage bei	
Kleie II a	=	„ „	24 Std. bei	37° C
Kleie II b	=	„ „	48 Std. bei	
Kleie II c	=	„ „	5 Tage bei	

Nach Verlauf der angegebenen Termine wurden die Proben verarbeitet. Kleie I a und Kleie II a mögen als Beispiele herausgegriffen werden. 4. März 1910.

	Kleieprobe I a	Kleieprobe II a
Bruttogewicht	161,60 g	161,44 g
Gewicht des Becherglases	45,00 g	44,98 g
Angefeuchtetes Krüsch netto . .	116,60 g	116,46 g
Auf 2 g ursprünglich trockenes Material entfallen daher	$\frac{116,60\text{ g}}{20} = 5,830$ g angefeuchtetes Material	$\frac{116,46\text{ g}}{20} = 5,823$ g angefeuchtetes Material

B. Sesamkuchen VIII. 5. Mai 1910: 6 Proben des zerkleinerten Kuchens wurden wie sub A abgewogen, mit sterilem Wasser befeuchtet, zugedeckt und bezeichnet als:

Sesamkuchen VIII a	=	angefeuchtetes Material	24 Std. bei	22° C
Sesamkuchen VIII b	=	„ „	48 Std. bei	
Sesamkuchen VIII c	=	„ „	5 Tage bei	
Sesamkuchen VIII 1	=	„ „	24 Std. bei	37° C
Sesamkuchen VIII 2	=	„ „	48 Std. bei	
Sesamkuchen VIII 3	=	„ „	5 Tage bei	

Am 6. Mai 1910 zeigte z. B.

	Sesamprobe VIII a	Sesamprobe VIII 1
Bruttogewicht	164,40 g	160,53 g
Tara (Glas)	46,00 g	43,50 g
Angefeuchtetes Material netto	118,40 g	117,03 g
Auf 2 g trockenen Sesamkuchen entfallen demnach	$\frac{118,40\text{ g}}{20} = 5,920$ g	$\frac{117,03\text{ g}}{20} = 5,851$ g angefeuchtet. Material.

Diese Mengen von 5,830 und 5,823 g sub A, bzw. 5,920 und 5,851 g sub B wurden, nachdem die Probe im Becherglas tüchtig durchmischt worden war, in sterile Uhrschalen abgewogen und wie früher bei der Verarbeitung der frischen Kraftfuttermittel angegeben, unter Zusatz einer bestimmten Menge sterilen Wassers in ausgeflammtem Tigel zu einem feinen Brei zerrieben, die nötigen Verdünnungen hergestellt und die angelegten Kulturen nach genügender Entwicklung sowohl quantitativ als qualitativ auf Bakterien untersucht. Ganz analog gestaltete sich die Untersuchung des angefeuchteten Materials bei allen andern Proben.

Vor allem zu Vergleichszwecken für die Bakterienflora in quantitativer Hinsicht mußte man irgendeinen Grundmaßstab für die zur Untersuchung gekommenen Mengen von frischem und gärendem Kraftfutter wählen. Als hiezu am geeignetsten schien uns das trockene, frische Material, wie es in den Handel kommt. Daher finden sich die Keimzahlen überall auf das trockene Material reduziert. Selbstverständlich mußten, da im angefeuchteten Kraftfutter die Keimzahl meist rasch zu enormer Höhe anschwoll, auch viel größere Spannweiten in den Verdünnungen gewählt werden, so daß Platten und hohe Schichten mit der Impfung von $^1/_{1000}$ Millionstel Gramm gar nicht selten waren.

b) Gewinnung der zu Impfzwecken verwendeten Milchproben.

α) Bezugsort: Es schien uns angezeigt, nicht nur den Bakteriengehalt der frischen und gärenden Futtermittel an und für sich zu untersuchen, sondern auch zu ermitteln, welchen Einfluß die Impfung einer kleinen Menge von diesen Proben auf die Gestaltung und Veränderung der Mikroflora in der Milch auszuüben vermöge. Wir gingen dabei von der Ansicht aus, daß es in der Praxis nicht zu den Seltenheiten gehört, wenn kleine Mengen eines in Gärung übergegangenen Futtermittels in die Milch gelangen. Einen allfälligen diesbezüglichen Einfluß festzustellen hatte nun die Impfung sowohl von frischer Konsummilch, als auch von steriler Milch zur Aufgabe. Die gesamte für unsere Untersuchungen benötigte Milch wurde vom Gutsbetriebe der zürcherischen landwirtschaftlichen Schule „Strickhof"[1]) bezogen und zwar aus ganz bestimmten Gründen.

Schon von jeher war nämlich in unserem Laboratorium die Erfahrung gemacht worden, daß die Milch, die man vom Strickhof bezog, verhältnismäßig keimarm war. Wenn man sich nun auch auf dem Gutsbetriebe der landwirtschaftlichen Schule keiner außergewöhnlichen Maßnahmen bei der Milchgewinnung bedient, so wird hier doch durch entsprechende Sorgfalt und Vorsicht beim Füttern und Melken, in der Stallordnung, in der Behandlung der Milch und Milchgefäße die Ursache obiger Erscheinung zu suchen sein.

Für die bakteriologischen Untersuchungszwecke, vor allem dann, wenn es sich, wie in unserem Falle, darum handelt, den Einfluß einer Impfung auf die Veränderung der Bakterienflora in gewöhnlicher Konsummilch festzustellen, eignet sich naturgemäß eine Milch um so besser, je keimärmer sie ist; denn wenn die Milch einmal mit einer bestimmten Pilzspezies bis zu einem gewissen Grade angereichert ist, so wird einerseits die relative Zahl der durch die Impfung hinzugefügten Keime zu gering; andererseits aber werden die ehemals günstigen Bedingungen des Nährsubstrats durch die bereits vorhandenen Mikroorganismen schon zu stark verändert sein, als daß noch irgendeine deutlich hervortretende Influenz durch das Impfmaterial nachzuweisen möglich sein wird. Wir mußten daher vor allem auch auf die Verwendung einer möglichst keimarmen Milch bedacht sein. Ferner hielten wir für angezeigt, stets eine Milch gleicher Herkunft zu verwenden, weil wir die Resultate der einzelnen Untersuchungen zu Vergleichszwecken heranziehen wollten, und da schien es uns nicht unwesentlich, alle Faktoren auszuschalten, die irgendeinen unkontrollierbaren Einfluß auf die Einzelresultate, wie dies eben durch eine Milch verschiedener Herkunft leicht der Fall sein könnte, auszuüben imstande wären.

β) Herstellung der Proben: Die Milch wurde stets als Mischmilch verwendet und nach tüchtigem Umrühren im Sammelgefäß, das außerhalb des Stalles aufgestellt war, wurde die nötige Menge in lauwarmem Zustande in einen gut gereinigten, sterilisierten Glaskolben gefaßt und sofort im Laboratorium verarbeitet. Vorerst mußte jeweils die Mikroflora der frischen

---

[1]) Wir gestatten uns an dieser Stelle dem Direktor der Anstalt Herrn Dr. Glättli für das liebenswürdige Entgegenkommen den verbindlichsten Dank auszusprechen.

Milch selbst ermittelt werden und daher wurde diese auf Molkengelatineplatten, Milchzuckeragarplatten und Milchzuckeragar hohe Schichtkultur in den notwendigen Verdünnungen verarbeitet. Nun wurde die nötige Zahl der eigens für diesen Zweck bereit gehaltenen sterilisierten Erlenmeyerkölbchen von 150 ccm Inhalt mit je 100 ccm der frischen Milch beschickt. Schon am Tage vorher hatten wir jeweils auf gleiche Art und Weise die erforderliche Zahl Erlenmeyerkölbchen mit sterilisierter Milch bereit gemacht. Diese sterile Milch wurde so hergestellt, daß frische Konsummilch zu 100 ccm in möglichst gut gereinigte, ebenfalls 150 ccm fassende Erlenmeyer abgemessen wurde. Die Kölbchen erhielten einen mäßig stark verschließenden Wattenpfropf, und um das Durchnässen des Letztern während des Verbleibens im Autoklav zu vermeiden, wurde der Stopfen und die Kölbchenmündung noch mit einem Käppchen von Staniol oder Pergamentpapier überzogen. Die Milch wurde hierauf während ¾ Stunden bei ½ Atmosphäre Überdruck sterilisiert, wobei sie sich nur ganz schwachbräunlich verfärbte. Die auf beschriebene Weise hergestellten gewöhnlichen Konsummilchproben wie die sterilen Milchproben wurden dann gleichzeitig mit dem gleichen Impfmaterial beschickt und bis zur makroskopischen Veränderung bei 37°, 22° resp. 12° C aufbewahrt.

c) Über Impfmaterial und Impfung.

Bei den Fällen von eingehenden Untersuchungen hatten wir nun von ein und derselben Futtermittelprobe folgende verschiedene Materialien:

1. Frisches Kraftfutter.
2. Angefeuchtetes Kraftfutter 1 Tag bei 22° C.
3. Angefeuchtetes Kraftfutter 2 Tage bei 22° C.
4. Angefeuchtetes Kraftfutter 5 Tage bei 22° C.
5. Angefeuchtetes Kraftfutter 1 Tag bei 37° C.
6. Angefeuchtetes Kraftfutter 2 Tage bei 37° C.
7. Angefeuchtetes Kraftfutter 5 Tage bei 37° C.

Mit allen diesen sieben, in Aussehen und Bakteriengehalt ursprünglich absolut identischen, jetzt aber ganz verschiedenen Impfmaterialien hatten wir nun je sechs der eben besagten Milchproben in Erlenmeyerkölbchen, nämlich je drei Proben frischer und je drei Proben steriler Milch zu impfen. Dabei wurde, wie früher erwähnt, so viel gärendes Impfmaterial abgewogen, daß es 2 g frischem Material entsprach, mit 200 ccm sterilem Wasser im sterilisierten Tiegel zu einem feinen Brei zerrieben und dann jede Milchprobe mit 1 ccm Emulsion, also mit $^1/_{100}$ g des Materials beschickt. So diente also jede der sieben oben angegebenen Proben zu je sechs Impfungen. Diese geimpften Milchproben wurden bei folgenden Temperaturen aufgestellt: Je eine mit dem gleichen Impfmaterial beschickte frische und sterile Milch zu 37° C, weitere zwei der gleichen Serie kamen zu 22° C und die letzten zwei der Serie wurden zu 12° C gebracht. Im ganzen kamen also 14 Proben (7×2) zu 37° C, ebenso viele zu 22° C und zu 12° C. Sobald nun eine deutliche makroskopische Veränderung der unter beständiger Kontrolle stehenden Milchproben wahrgenommen werden konnte, wurde die betreffende Probe sofort einer eingehenden Untersuchung unterworfen. Vorerst wurde das makroskopische Aussehen vermerkt; dann wurden Säuregrad, Geruch und Geschmack festgestellt, ferner wurden Präparate im hängenden Tropfen angefertigt und endlich wurden Molkengelatineplatten, Milchzuckeragarplatten und Milchzuckeragar hohe

Schicht angelegt, um genauen Aufschluß über Zahl und Arten der in der betreffenden Milch sich vorfindenden Bakterien zu erhalten. Selbstredend wurde jede Milchprobe vor der Verwendung tüchtig durchmischt, um einen möglichst genauen Durchschnitt zu erhalten.

d) Die Bestimmung des Säuregrades der Milch.

Nach gutem Umrühren wurden 20 ccm der Milch abgemessen und mit 80 ccm destilliertem Wasser in ein Becherglas hinausgespült. Dann wurden 2 ccm 2-proz. Phenolphthaleïn in konzentrierter alkoholischer Lösung beigegeben und nun nach und nach so viel n/10 NaOH zugesetzt, bis sich die verdünnte Milch schwach rosa verfärbt hatte. Die Anzahl Kubikzentimeter der so verbrauchten Lauge bezeichneten wir als Säuregrad. Von dem auf diese Weise gefundenen Ergebnis mußte, da es sich um die Säuregradsbestimmung von geimpfter, ehemals steriler Milch handelte, jeweils noch der Säuregrad der betreffenden sterilen Milch selbst subtrahiert werden, meistens 3,3—3,5 ccm n/10 NaOH. Alle in dieser Arbeit vorkommenden Angaben über Säuregrade der Milch sind nach dem eben beschriebenen Verfahren ermittelt.

Zu der oben angegebenen Gesamtzahl von 42 Milchproben (7 × 6) brauchten wir noch drei sogenannte Kontroll-Milchproben, nämlich je eine für die drei gewählten Temperaturen von 37, 22 und 12° C. Diese Kontrollproben waren natürlich gleicher Herkunft wie die geimpften Proben, nur fehlte die Impfung. — Ein allseitiger Vergleich der Bakterienflora in frischen und gärenden Futtermitteln, die Untersuchung der frischen Milch und der sogenannten Kontrollproben einerseits, und die Ermittlung der Flora der geimpften Milchproben andererseits förderte manche interessante Beobachtung zutage, auf die wir später im speziellen Teile näher zu sprechen kommen werden.

4. Die zur Untersuchung von frischen und gärenden Kraftfuttermitteln am besten geeigneten Nährböden.

a) Quantitative Bestimmungen.

Um vorerst zu prüfen, auf welchen Nährböden sich speziell die in den drei zu untersuchenden Kraftfuttermitteln enthaltenen Spaltpilzarten am besten entwickeln, wurden mehrere vergleichende Serien von Vorversuchen durchgeführt. Wir wählten dazu drei verschiedene Gelatine-Nährböden für Plattenkulturen, nämlich gewöhnliche Gelatine, Molkengelatine und Peptonschottengelatine; ferner vier verschiedene Agarnährböden ebenfalls als Plattenkulturen und zwar: Gewöhnlicher Agar, Milchzuckeragar, Traubenzuckeragar und Peptonschottenagar. Für hohe Schicht wurden die drei letztgenannten Nährböden verwendet. Über die Herstellung dieser Nährmedien siehe auf Seite 3—4. Die drei Gruppen der mit gleichen Quantitäten des Untersuchungsmaterials geimpften Nährmedien wurden drei verschiedenen Temperaturen ausgesetzt und zwar wurden folgende Temperaturen gewählt: Für hohe Schichtkultur 37° C, für Agarplatten 30° C und für Gelatineplatten 18—20° C (Zimmertemperatur).

Die Vorversuche wurden vorwiegend mit Kleie durchgeführt. Von Erdnuß und Sesam wurde nur eine beschränkte Zahl von Stichproben vorgenommen. Dagegen wurden im Verlaufe der eigentlichen Untersuchung vielfach Parallelkulturen mit dem einen oder andern der genannten Nährböden angelegt. Dabei fanden wir die Resultate der Vorversuche immer wieder bestätigt. Im nachfolgenden greifen wir nun ein einzelnes ausführliches Beispiel zur

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Demonstration heraus. Untersuchungsmaterial war frische Kleie, die am 6. Juli 1908 aus der Mühle am obern Mühlesteg, Zürich, abgeholt wurde. Mit dem frischen Material wurden nun sofort die in der nachfolgenden Tabelle angeführten Nährböden mit durchwegs gleichen Impfmengen geimpft. Ferner wurden sechs Portionen zu je 40 g in sterile Bechergläser abgewogen und mit der doppelten Menge sterilen Wassers angefeuchtet, bei 22° resp. 37° C in Gärung belassen und nach je 1, 2 resp. 5 Tagen untersucht. Die gesamte bezügliche Arbeitsmethode ist auf Seite 4—12 ausführlich angegeben.

Tabelle I.

Vergleichende Zusammenstellung der durch die verschiedenen Nährböden ausgewiesenen Keimzahlen.

Art des Nährbodens und Kulturart	a) Kleie frisch	b) Kleie angefeuchtet bei 22° C gegoren		
	Kleie I nicht gegoren	Kleie I a 24 Std. bei 22° C	Kleie I b 48 Std. bei 22° C	Kleie I c 5 Tage bei 22° C
1. Gelatineplatten:	Mill.	Mill.	Mill.	Mill.
a) Gewöhnliche Gelatine .	**0,75** 1)	**6700** 1)	14 300 1)	24 000 1)
b) Molkengelatine	0,68	**6700**	**14 800**	**26 600**
c) Peptonschottengelatine .	0,70	5930	10 300	25 800
2. Agarplatten:				
a) Gewöhnlicher Agar . .	**3,90**	3500	9 200	29 400
b) Traubenzuckeragar. . .	3,82	**6000**	**13 000**	**39 000**
c) Milchzuckeragar	3,13	**5900**	12 500	36 000
d) Peptonschottenagar . .	**3,90**	5500	11 000	37 000
3. Hohe Schichten:				
a) Traubenzuckeragar. . .	**0,85**	2350	**3 300**	42 000
b) Milchzuckeragar	0,65	**2400**	2 800	**43 000**
c) Peptonschottenagar . .	0,32	1500	2 900	35 000

Die Zusammenstellung zeigt uns auf den ersten Blick, daß die Bakterienflora in frischer und gärender Kleie nicht auf dem gleichen Nährboden das Maximum ihrer Entwicklung erreicht. Von den drei Gelatinenährböden scheint den im frischen Krüsch vorkommenden Arten die gewöhnliche Nährgelatine am besten zuzusagen, da hier pro Gramm 750 000 Keime gezählt wurden, resp. Kolonien sich entwickelten; während auf Molkengelatine nur 680 000 nachweisbar waren. Peptonschottengelatine lehnt sich ziemlich an Molkengelatine an. Die Bakterien im frischen Kleiematerial scheinen demnach die Milchzucker haltigen Gelatine-Nährböden nicht zu bevorzugen. Auch durch die verschiedene Wachstumsintensität auf den Agarplatten wird diese Ansicht bestätigt. Auf gewöhnlichem Agar finden wir eine Keimzahl von 3 900 000, die, wie aus anderen Fällen zu schließen ist nur als Ausnahmefall auch auf dem Peptonschottennährboden erreicht wird; während die analoge Zahl auf Milchzuckeragar ungefähr 20 Proz. im Rückstand verblieb. Der gewöhnliche Agar als Plattenkultur verdient demnach für die Untersuchung des frischen Materials den Vorzug. Für die Kultur in hoher Schicht eignen sich nach unsern Versuchsergebnissen sowohl Traubenzucker- als auch Milchzuckeragar in ungefähr gleichem Maße, während von der Verwendung von Peptonschottenagar abzuraten ist.

---

1) Die Zahlen beziehen sich überall auf 1 g trockenes frisches Material.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Etwas anders als bei frischem Material gestalten sich die Verhältnisse schon beim 24 Stunden alten angefeuchteten und gärenden Futtermittel. Die gewöhnliche Gelatine vermag ihren Rang als bestgeeigneten unter den Gelatinenährböden hier nur noch knapp zu behaupten, während Traubenzucker-, Milchzucker- und Peptonschottenagar-Platten eine bedeutend höhere Zahl als die nicht zuckerhaltige Parallelprobe von Fleischwasserpeptonagar zur Entwicklung brachten. Der Überschuß beträgt 41 resp. 36 Proz. In hoher Schicht erwiesen sich Traubenzucker- und Milchzuckeragar bedeutend vorteilhafter als Peptonschottenagar.

Tabelle II gibt Aufschluß über die Wachtumsverhältnisse der Bakterien aus Kleieproben, die bei 37° C gegoren hatten.

Art des Nährbodens	Gärende Kleie angefeuchtet bei 37° C		
	Kleie I 1 24 Std. bei 37° C	Kleie I 2 48 Std. bei 37° C	Kleie I 3 5 Tage bei 37° C
1. Gelatineplatten:	Mill.	Mill.	Mill.
a) Gewöhnliche Gelatine	29 000	850	36
b) Molkengelatine	**36 000**	**2800**	**430**
c) Peptonschottengelatine	35 000	2700	380
2. Agarplatten:			
a) Gewöhnliche Agarplatten	24 000	1100	70
b) Traubenzuckeragarplatten	37 000	**3400**	480
c) Milchzuckeragarplatten	**38 000**	3200	**560**
d) Peptonschottenagarplatten	29 000	2800	330
3. Hohe Schichten:			
a) Traubenzuckeragar	18 000	**1700**	540
b) Milchzuckeragar	**19 000**	1600	**600**
c) Peptonschottenagar	15 000	1400	310

Die Kleie, die angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war, zeigte Zeichen starker Gasentwicklung. Es finden die in gärendem Material hauptsächlich zur Vermehrung gelangten Mikroorganismen in der zuckerhaltigen Gelatine vermutlich bedeutend günstigere Wachstumsbedingungen als in gewöhnlicher Gelatine. Ähnlich verhält sich die Sache bei den Agarplatten. Für die hohe Schicht sind Milchzuckeragar und Traubenzuckeragar ungefähr gleich günstige Nährmedien. — Noch deutlicher als bei der während 24 Stunden gegorenen Kleie treten die Wachstumsdifferenzen zwischen den zuckerhaltigen und zuckerfreien Nährböden bei dem während 48 Stunden in Gärung belassenen Material auf. Es macht sich also bei der Spaltpilzflora die Tendenz geltend, die zuckerhaltigen Nährmedien zu bevorzugen, sobald die Kleie eine Gärung durchgemacht hat.

Bei Erdnußmehlen und -kuchen, sowie bei Sesammehlen und -kuchen wird, wie die einschlägigen Versuche zeigten, für die Agarplattenkultur des frischen wie des gärenden Materials zweckmäßigerweise Milchzuckeragar statt gewöhnlicher Agar verwendet.

b) Kurze Bemerkungen über qualitative Ergebnisse.

Der Umstand, daß die einzelnen Nährböden große quantitative Abweichungen in der Bakterienflora aufweisen, erklärt sich aus den verschiedenen

Ansprüchen, welche die im Untersuchungsmaterial enthaltenen Arten an den Nährboden stellen. Wenn eine Gärung bei 37° C stattfindet, so werden wohl vor allem den Arten aus der Gruppe der Milchsäurebakterien optimale Wachstumsbedingungen geboten. Diese entwickeln sich daher in angefeuchteten Futtermitteln äußerst rasch, und falls sie nun auf einen zuckerhaltigen Nährboden übertragen werden, so werden auch manche verhältnismäßig lebensschwache Keime noch eine Kolonie zu bilden vermögen, während bei Mangel an Zucker nur die kräftigeren Individuen zum Wachstum kommen. Bei der während 5 Tagen in Gärung verbliebenen Kleie tritt diese Erscheinung am deutlichsten zutage. Hier haben die Milchsäurebildner weitaus die Oberhand.

Nachfolgend eine gedrängte Zusammenstellung der wichtigsten Arten, welche überall in der Reihenfolge ihrer quantitativen Vertretung angeführt sind.

Kleie-Probe I: Bact. herbicola aureum Burri et Düggeli, Bacillus mesentericus (Flügge) L. et N., Bacterium acidi lactici Hüppe, vereinzelt gelber Gasbildner Holliger, selten Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N. und Kokken.

Probe Ia. Bact. acidi lactici, gelber Gasbildner, Bact. fluorescens in unbedeutender Zahl, daneben Bact. herbicola aureum, Bacillus mesentericus, selten gelber Säurebildner Levy und ein unbekanntes, dem Bact. putidum (Flügge) L. et N. ähnliches Kurzstäbchen.

Probe Ib. Überwiegend Bacterium acidi lactici, in bedeutender Zahl gelber Gasbildner, seltener Bacterium herbicola aureum, von Bacterium fluorescens nur mehr wenige Vertreter; erstes Auftreten von Bacterium Güntheri[1]) L. et N.

Probe Ic. Starke Zunahme von Bacterium Güntheri, Bacterium acidi lactici ist immer noch zahlreich; gelber Gasbildner hat abgenommen; Bacterium herbicola aureum und Bacterium fluorescens sind ganz verschwunden; dafür ist Bacterium putidum in sehr bescheidener Menge vertreten; keine Anaeroben nachweisbar.

Probe I1. Explosionsartiges Auftreten von Gas- und Säurebildnern (Bacterium acidi lactici, Bacterium lactis aërogenes Escherich, gelber Gasbildner und gelber Säurebildner); daneben in bescheidener Menge Bacterium herbicola aureum, Bacterium fluorescens, Bacillus mesentericus; in hoher Schicht einige Kokken und Bacterium Güntheri.

Probe I2. Bacterium Güntheri stark hervortretend, die gasbildenden Arten noch in bedeutender Menge vorhanden, Bacillus mesentericus und Bacterium herbicola aureum sind nur noch ganz selten, Bacterium fluorescens ist ganz verschwunden.

Probe I3. Weit überwiegend kommt Bacterium Güntheri vor, alle anderen Arten sind stark zurücktretend.

Die Bakterienflora hat also im Verlaufe der Gärung eine ganz bedeutende Veränderung, nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ, erfahren. In der frischen Kleie haben das Bacterium herbicola aureum (Burri et Düggeli) und Bacillus mesentericus (Flügge) L. et N. entschieden die Oberhand, während die Gasbildner und die Fluoreszenten nur vereinzelt auftreten; ebenso spielen die Kokken nicht eine hervorragende Rolle.

Schon nach 24-stündiger Gärung bei 22° C sehen wir, daß Bacterium herbicola aureum und Bacillus mesentericus auffällig zurücktreten; die Gasbildner haben zugenommen, die Kokken gehen dem Verschwinden entgegen, da diese offenbar die überhandnehmende Säurebildung nicht gut vertragen.

Nach 48 Stunden bei 22° C sind die Gasbildner, besonders jene aus der

---

[1]) = Bact. lactis acidi Leichmann = Streptococcus acidi lactici Grotenfeldt = Streptococcus lactis (Lister) Löhnis.

Coli-aërogenes-Gruppe schon im Übergewicht. Auch das typische, nichtgasbildende Milchsäurestäbchen, das Bacterium Güntheri L. et N. vermag deutlich hervorzutreten. Nach 5-tägiger Gärung ist die Kleie schon in ein Stadium bedeutender Zersetzung übergegangen. Die Milchsäurebildner sind nun fast in Reinkultur da. Das Bact. herbicola aureum ist ganz verschwunden, ebenso das ehemals ziemlich stark vertretene Bacterium fluorescens. An Stelle des letzteren ist, zwar in ganz untergeordneter Menge, die nicht verflüssigende Parallelart, das Bact. putidum getreten.

Ein ganz analoger Wechsel in der Vertretung der einzelnen Arten vollzog sich bei der angefeuchteten und zu 37° C gestellten Kleie. Nur bewegt sich der Wechsel in etwas andern Bahnen. Die gasbildenden Milchsäurebakterien gewannen hier weit rascher und entschiedener die Oberhand, da für diese Gruppe optimale Temperaturverhältnisse geschaffen wurden. Die andern Arten wurden von diesen Gasbildnern schon nach kurzer Zeit überwuchert, und schließlich trat das fast bei jeder sauren Gärung vertretene Bacterium Güntheri L. et N., das anfänglich im Material gar nicht nachweisbar war, ganz in den Vordergrund.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Voruntersuchung, die durch die Resultate der eigentlichen Untersuchung bestätigt und ergänzt wurden, sind:

1. In bezug auf Verwendung verschiedener Nährböden für die Untersuchung frischer und gärender Kraftfuttermittel:

a) Als Plattenkulturen sind für die Untersuchung frischen Materials bei Kleie die nichtzuckerhaltigen Nährböden (Fleischwasserpepton-Gelatine und -Agar) den zuckerhaltigen in der Regel vorzuziehen. Damit ist aber nicht ausgeschlossen, daß unter Umständen in zuckerhaltigen Nährböden ein ebenso gutes Resultat erzielt werden kann. Bei Erdnuß und Sesam tritt an Stelle von Fleischwasserpeptonagar für die Plattenkultur immer zweckmäßigerweise Milchzuckeragar.

b) Für die Untersuchung von gärenden Kraftfuttermitteln dagegen ist die Verwendung von zuckerhaltigen Nährmedien für Plattenkulturen entschieden angezeigter. Der Grund liegt wohl in der raschen Veränderung der qualitativen Bakterienflora während des Gärungsprozesses. Die Arten, welche hier die Hauptrolle spielen, sind imstande, den dargebotenen Zucker mit Vorteil als Energiequelle zu benutzen. Traubenzucker wirkt fast ebenso günstig als Milchzucker; Peptonschottenagar scheint nur für spezielle Fälle angezeigt.

c) Für hohe Schichtkultur, bzw. für die Untersuchung von frischen und gärenden Kraftfuttermitteln auf anaerobe Mikroorganismen eignen sich Traubenzucker- und Milchzuckeragar.

2. In bezug auf die Flora:

a) In gärenden Kraftfuttermitteln steigt die Zahl der Bakterien ungemein rasch.

b) Es findet während des Gärungsprozesses ein beständiger Wechsel in der qualitativen Zusammensetzung der Flora des Gärmaterials statt. Der Gärverlauf erscheint daher als ein metabiotischer Vorgang.

II. Teil.

Die Kraftfuttermittel im einzelnen.

I. Kleie.

1. Historische Übersicht über die bisherigen Forschungsresultate.

Die Kleie entsteht bekanntlich als Abfallprodukt bei der Mehlgewinnung; sie ist daher das am weitesten verbreitete Beifuttermittel. Als eigentliches Kraftfutter kann man dieselbe zwar nicht bezeichnen, da der Gehalt an wertvollen, leicht verdaulichen Nährstoffen weit hinter jenen der eigentlichen Kraftfuttermittel zurücksteht. Trotzdem bildet die Kleie, sobald die nötige Feuchtigkeit hinzutritt, einen verhältnismäßig günstigen Nährboden für die Mikroorganismen. Pott (105[1]) gibt die mittlere Zusammensetzung der Kleie wie folgt an:

	Feine Kleie %	Grobe Kleie %
N-haltige Stoffe	15,0	14,2
Rohfett	4,3	3,5
N-freie Extraktivstoffe	56,4	53,3
Holzfaser	7,0	10,0
Asche	4,8	6,0
	87,5	87,0

Nach A. Morgen soll von den Wiederkäuern 76,6 Proz. des Gesamtstickstoffes, nach Druckes sogar 86,7 Proz. verdaut werden.

Wenn auch die Kleie seit vielen Jahrzehnten schon an die landwirtschaftlichen Nutztiere verfüttert wurde und somit das älteste Beifutter ist, so wurde sie dennoch erst in neuerer Zeit zum Gegenstand der wissenschaftlichen Untersuchung gemacht. Die meisten diesbezüglichen Arbeiten sind aber rein chemischer Natur. — Im folgenden soll das Wesentliche, was in den letzten 20 Jahren über den Gegenstand veröffentlicht wurde und uns zugänglich war, kurz zusammengefaßt werden.

Stellwag (122) stellte 1890 fest, daß die Fettbestandteile bei Roggen-, Weizen- und Gerstenkleie ähnliche Zusammensetzung haben; ¾ von allen Fetten sei Neutralfett. Nachgewiesen wurden Cholesterin und Lecithin. G. Loges (89) untersuchte im gleichen Jahre besonders Roggen- und Weizenkleie auf Verfälschung und fand, daß ⁴/₅ aller Handelskleie mehr oder weniger verfälscht war. Als häufigste Beimengung gibt der Verf. Kornausputz an; ferner fanden sich regelmäßig: Sand, Erde, Haferspelzen, Mutterkorn, verschiedene Unkrautsamen usw. 1891 folgte vom nämlichen Autor eine weitere Untersuchungsserie Bakteriologische Angaben fehlen aber ganz. Nach gleicher Richtung wie die Arbeiten Loges' erstrecken sich auch die Untersuchungen von Reszler (111). Dieser Autor gibt an, daß in Frankreich als Verfälschungsmittel für Kleie vor allem die billigeren Reisschalen benutzt werden. Eingehende vergleichende chemische Untersuchungen über den Nährstoffgehalt führten den Verf. zu dem Schlusse, daß 100 kg Reisschalen, die dem Landwirt für 10—12 Frcs. verkauft werden, kaum einen wirklichen Nährwert von 2 Frcs. haben. Schultze-Braunschweig (116) unternahm 1892 ziemlich eingehende Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der Kleie, und auf Grund der bezüglichen Ergebnisse stellte er den

---

[1] Die in () angegebenen Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis am Schlusse der Arbeit.

Wert als Futtermittel fest. Th. Hunt (75) stellte vergleichende Versuche an über den Einfluß des Baumwollsaatmehles und der Kleie in ihrer Wirkung auf die Butterqualität. Über das Vorkommen von Mikroorganismen in den untersuchten Futtermitteln finden sich bei keinem der genannten Verff. irgendwelche besondere Angaben. Erst Wood und Wilcox (136) faßten neben der chemischen zum ersten Male auch die bakteriologische Seite etwas näher ins Auge. Sie bezeichnen als Erreger der Kleiegärung zwei angeblich in Symbiose lebende, einander nahe verwandte Mikroorganismen, die sie Bacterium Furfuris α und Bacterium Furfuris β nannten. Besonders eingehend wurden die chemischen Veränderungen, welche die beiden Bakterienspezies an der Kleie hervorriefen, erforscht. Die Verff. fanden u. a. als Gärprodukte: Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure usw. Die Mengenverhältnisse dieser Produkte wurden genau angegeben. Ferner wurde die Entwicklung verschiedener Gase nachgewiesen, so CO_2, O, H u. N. Uns gelang es nicht, aus irgendeiner der untersuchten Kleieproben eine dem Bacterium Furfuris identische Mikrobe zu isolieren.

Die ersten eingehenderen Angaben über die Zahl der Mikroorganismen auf den Kleie liefernden Getreidearten stammen von Hoffmann (71). Verf. untersuchte Weizen-, Roggen- und Gerstenkörner in frischem Zustande und nach einer längeren Zeit trockener Aufbewahrung in Blechbüchsen und fand, daß auf trockenem, sauber aufbewahrtem Getreide die Bakterienzahl beständig abnimmt. Natürlich steht die Bakterienflora des Getreides mit der Flora der von diesem Getreide stammenden Kleie in engstem Zusammenhang. Die Versuche Hoffmanns erstreckten sich auf die Gesamtzahl der Bakterien, auf die Zahl der Verflüssigenden und auf die Zahl der auf dem Getreide vorkommenden Schimmelpilze. Im Durchschnitt wurden pro Gramm gefunden:

Gesamtbakterienzahl:	**74 000—11 640 000**
Davon verflüssigend:	**0— 1 670 000**
Schimmelpilze:	**0— 440 000**

Es zeigte sich also sowohl quantitativ als qualitativ ein starker Wechsel in der Mikroflora der Getreidekörner, ganz analog wie wir dies bei der Kleie zu konstatieren sehr oft Gelegenheit hatten. — Bei ganz erstklassiger, von halben Körnern sorgfältig befreiter Ware war der Bakteriengehalt nach Angabe des genannten Autors bedeutend geringer. Die Keimzahl betrug hier pro Gramm 160—200 000. Regelmäßig trat bei Einweichversuchen sehr sorgfältig ausgewählter Gerstenkörner eine dem Bacillus proteus (Kruse) ähnliche Art auf, die, wie der Verf. angibt, stets einen starken unangenehmen Geruch verursachte. Diese Proteus ähnliche Art fand sich auch hin und wieder in Kleie. Der Fäulnisgeruch war auch hier, wie bei fast allen angefeuchteten Futtermitteln nach kürzerer oder längerer Dauer ziemlich regelmäßig festzustellen.

Hoffmann hat also große Unterschiede in der Bakterienflora auf dem Getreide nachgewiesen. In ähnlichem Sinne spricht sich Löhnis (92) in seinem „Handbuch der landw. Bakteriologie“ aus, und zwar über die Kraftfuttermittel im allgemeinen. Er sagt, „daß der Keimgehalt, der unter dem Namen Kraftfuttermittel zusammenzufassenden Kuchen und Mehle usw., ebenso wie in bezug auf die Zahl, so auch in bezug auf die vorhandenen Spezies innerhalb weiter Grenzen schwanke“. Die größte Aufmerksamkeit wurde bei der Untersuchung der Futtermittel auf Kleinlebewesen von jeher den Schimmelpilzen zugewendet, weil man zuerst allgemein annahm, daß hier das Kriterium für die Frische und Güte der Kraftfuttermittel liege. Doch hat sich diese

Annahme bis heute nicht bestätigt; im Gegenteil machten Hiltner (68), Emmerling (37), Haselhoff (58), Gordan (50) und verschiedene andere Forscher darauf aufmerksam, daß in dieser Beziehung den Bakterien wohl eine größere Bedeutung zukomme. Gordan hat sich besonders eingehend mit dem Verhältnis der Schimmelpilze und Bakterien in Roggen- und Weizenkleie befaßt. Der Autor stellte fest, daß mit ziemlicher Regelmäßigkeit alle Kleieproben, die in befeuchtetem Zustande im Thermostaten wenig Schimmelbildung zeigen, stets eine sehr bedeutende Anzahl von Bakterien enthalten, und daß umgekehrt bei Proben mit starker Schimmelbildung relativ wenig Bakterien sich nachweisen lassen. Gordan führte diese Tatsache darauf zurück, daß die durch die Bakterien gebildeten Zersetzungsprodukte die Schimmelbildung unterdrücke und stellt für die Beurteilung der Kleiequalität den Grundsatz auf, daß im allgemeinen gute Kleie viel Schimmel und wenig Bakterien, umgekehrt Kleie schlechter Qualität wenig Schimmel, aber um so mehr Spaltpilze enthalte. Diese Ansicht ist also der bisher herrschenden direkt entgegengesetzt. Der Verf. untersuchte auch die Kleie auf die verschiedenen Bakterienarten. Als solche wurden beschrieben: Bacillus liquefaciens, Bacillus flavus colisimilis und Bacterium coli. Das Bacterium coli, das in einer Menge von 0,1 mg guter Kleie nicht mehr nachgewiesen werden konnte, in minderwertiger Ware aber noch regelmäßig vorhanden war, wurde auch auf die Pathogenität geprüft. Sowohl intraperitoneale Einimpfung mit einem Absud von stark colihaltiger Kleie, als auch direkte Verfütterung an weiße Mäuse führten den Tod der Versuchstiere herbei.

R. Scherpe[1]) untersuchte Roggen- und Weizenkörner selbst, richtete aber sein Augenmerk mehr auf die auftretenden Schimmelarten und auf die durch diese bewirkte chemische Veränderung des Substrates. Das wichtigste Ergebnis seiner Untersuchungen ist, daß mit wechselndem Wassergehalt der Vorgang der Zersetzung ein wesentlich verschiedener sei. Appel und Koske (2) stellten Versuche an über die Wirkung einiger als gesundheitsschädlich verdächtiger Futtermittel und fanden, daß z. B. Brandsporen auf Getreidekörnern oder Getreidekleie beim Rind und Schwein keine deutlichen Krankheitserscheinungen hervorzurufen vermochten. Die Sporen gingen vielfach durch den Verdauungskanal ohne aufgelöst zu werden und waren nach Verlassen des Darmes noch keimfähig. Hoffmann und Spiegelberg (72) prüften die Kleie auf deren H_2O_2 zersetzende Bestandteile. Die Ermittlungen sind rein chemischer Natur. Allgemein gehaltene bakteriologische Untersuchungen an Kleie stellte Heinze (67) an. Er bemerkt, daß die in Futtermitteln vorkommenden Bakterien und Schimmel meist harmloser Natur seien. Viele gehen im sauren Magensaft zugrunde oder werden auffällig geschwächt. Andere bedingen, besonders im Magen der Wiederkäuer, verschiedene Umsetzungen und Gärungen, können aber auch Darmfäulnis einleiten. Um der Vermehrung der Mikroorganismen in Futtermitteln vorzubeugen, ist die trockene Aufbewahrung der Vorräte von besonderer Wichtigkeit. Nach E. Pott (105), Dammann, Hauptfleisch, Schultze und einer ganzen Reihe anderer Autoren ist die oft beobachtete schädliche Wirkung der Kleie, wenn diese in größeren Mengen verfüttert wird, meistens nicht auf deren Bakteriengehalt zurückzuführen; sondern die Kleie an und für sich soll, infolge Mangel an Reizstoffen, welche die Verdauung anregen, eine erschlaffende Wirkung auf den ganzen Verdauungsapparat ausüben. Sie macht matt und phlegmatisch. Bei Pferden führt sie nicht selten zu osteoporösen Krankheiten (Krüschkrankheit). Als häufigste Mikroben werden von Pott angegeben: Mikrokokken und ein Clostridium; „daneben aber auch Stäbchenbakterien". Hauptfleisch (60) fand in der Kleie besonders viele Brandsporen (von Tiletia), die sich nach Pusch und Brefeld in Übereinstimmung mit den Befunden von Appel und Koske, auch nach dem Durchgang durch den Darmkanal als noch keimfähig erwiesen haben. Ferner wurden Sporen von Mucor und Penicillium gefunden. Bezüglich des Vorkommens von Spaltpilzen in der Kleie gibt Hauptfleisch bloß einer Vermutung Raum, indem er sich äußert: „Übrigens gedeihen in solchen, in Zersetzung begriffenen Futtermitteln vorzüglich Bakterien, unter denen sich gewiß auch pathogene finden werden."

---

[1]) Chemische Veränderungen der Roggen- und Weizenkörner beim Schimmeln und Auswachsen. (Ref. Chem. Zentralbl. 1898. p. 398.)

Bei der bakteriologischen Untersuchung der Kleie wird wohl die Vermutung nahe liegen, daß die Flora des Futtermittels mit jener der Körner, von denen es stammt, identisch sei. Weiter könnte man schließen, daß das Getreidekorn und die grüne Getreidepflanze eine gleiche oder doch annähernd gleiche Flora bergen und daß diese Flora selbst wieder zum allergrößten Teile der umgebenden Erde entstamme. Eingehende Untersuchungen von Burri (18) und später von Düggeli (35) haben aber, im Gegensatz zu jenen von Esten und Mason ergeben, daß die Mikroflora der Getreidepflanzen, wie der grünen Gewächse überhaupt eine spezifische ist, die von der des umgebenden Bodens große Verschiedenheiten zeigt. Düggeli hat in seinen umfangreichen Versuchen auch nachgewiesen, daß diese epiphytische Flora vom Samen auf das aus diesem entstehende Keimpflänzchen übergeht und daß auf dem letzteren eine sehr bedeutende Keimvermehrung stattfindet. Diese Tatsache konnte bei den Pflanzen verschiedenster Art festgestellt werden. Uns interessieren vor allem die Verhältnisse auf den Getreidepflanzen. Als Gesamtkeimzahlen ergab sich:

	Auf Gerste	Auf Hafer	Auf Weizen	Auf Roggen
Pro Scheinfrucht	80 000	23 000	8 000	3 000
Auf der daraus gezogenen 5 cm langen Keimpflanze . . .	19 726 000	4 190 000	15 370 000	1 833 700

Diese Flora zeichnet sich aus durch eine große Einförmigkeit oder wie es der Autor nennt, durch „Armut an Arten". Die schleimhüllenproduzierenden Bakterien aus der Gruppe der Nichtsporenbildner sind die Regel, die Sporenbildner die Ausnahme. Zu dieser charakteristischen, sehr anspruchslosen und der epiphytischen Lebensweise besonders angepaßten Flora gehört vor allem das von Düggeli beschriebene und benannte Bacterium herbicola aureum, das mit Winklers Bacillus mesentericus aureus als identisch erklärt werden konnte. Fast ständige Begleiter dieses Bacterium herbicola aureum sind die beiden typischen Fluoreszenten: Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N. und Bacterium putidum (Flügge) L. et N. — Aus dem Gesagten läßt sich leicht erklären, weshalb wir die drei genannten Spaltpilze in der Kleie sehr häufig nachweisen konnten.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Außer den genannten hat sich noch eine ganze Reihe anderer Autoren mit der Untersuchung von Futtermitteln im allgemeinen und mit Kleie im einzelnen abgegeben. Wir können hier jedoch von einer weiteren Erörterung absehen, da die bezüglichen Arbeiten entweder die bakteriologische Seite gar nicht berücksichtigten oder nur ganz flüchtig streiften und die daherigen für unsere Untersuchungen in Betracht kommenden Resultate niemals über den Rahmen der bereits angeführten Ergebnisse herauszuwachsen vermochten. In der weit überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurde, wie bereits schon an anderer Stelle erwähnt, fast ausschließlich nur die chemische Untersuchung durchgeführt. Einige Verff. erwähnen dabei höchstenfalls noch die Schimmelbildung, der überhaupt schon von jeher die meiste Beachtung zuteil wurde. Die eigentliche Spaltpilzflora aber mußte aus nicht schwer zu erklärenden Gründen unberücksichtigt bleiben. Der Chemiker ist eben in der Regel nicht auch zugleich Bakteriologe und umgekehrt.

Wenn wir nun nach dem Durchgehen der uns zu Gebote gestandenen, reichlichen Literatur nochmals kurz Rückschau halten, was in bezug auf die bakteriologische Untersuchung der Kraftfuttermittel, speziell der Kleie geschehen ist, so müssen wir uns gestehen, daß ein sehr großer Teil dieses Gebietes noch brach vor uns liegt, und daß noch gar manche diesbezügliche Frage ihrer Lösung harrt.

2. Eingehende Untersuchung der Kleieprobe A.

Herkunft und makroskopisches Aussehen: Die Kleieprobe A war sogenannte grobe Kleie. Sie wurde am 2. März 1909 bei der Firma G. D., Stüßihofstatt-Zürich abgeholt. Das Untersuchungsmaterial war I. Qualität, sah ganz frisch aus, hatte einen normalen, deutlich aromatischen Geruch und stammte von inländischem Getreide.

Die Probe wurde einer ganz eingehenden Untersuchung unterworfen. Vorerst kam das frische Material zur Verarbeitung. Dann erfolgte die Untersuchung des gärenden Futtermittels und schließlich wurde die Einwirkung der Kleie auf frische Konsummilch geprüft. — Nachfolgend im Zusammenhang die gesamte Übersicht über die Verarbeitung:

	Kurze Bezeichnung:	
I. Untersuchung der frischen Kleie A.		
II. Untersuchung der gärenden Kleie:		
a) Angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C	Kleie I a	Serie I.
b) „ 48 „ „ 37° C	„ I b	
c) „ 5 Tage „ 37° C	„ I c	
d) „ 24 Stunden „ 22° C	„ I 1	Serie II.
e) „ 48 „ „ 22° C	„ I 2	
f) „ 5 Tage „ 22° C	„ I 3	
III. Untersuchung der frischen Konsummilch und der Kontrollproben:		
a) Konsummilch frisch	CM 1	Serie III.
b) Kontrollprobe a bei 37° C aufbewahrt	KM a	
c) „ b „ 22° C „	KM b	
d) „ c „ 12° C „	KM c	
IV. Einwirkung von Kleie auf die frische Konsummilch:		
1. Kleie A frisch, auf frische Milch:		
a) Geimpfte Probe zu 37° C gestellt	M I	Serie IV.
b) „ „ „ 22° C „	M II	
c) „ „ „ 12° C „	M III	
2. Kleie I a (siehe sub. II) auf frische Konsummilch:		
a) Geimpfte Milch bei 37° C aufgestellt	M I a	Serie V.
b) „ „ „ 22° C „	M I b	
c) „ „ „ 12° C „	M I c	

3. Kleie I b auf frische Konsummilch:	Kurze Bezeichnung:	
a) Geimpfte Milch zu 37° C	M II a	Serie VI.
b) „ „ „ 22° C	M II b	
c) „ „ „ 12° C	M II c	
4. Kleie I c auf frische Konsummilch:		
a) Geimpfte Probe zu 37° C	M III a	Serie VII.
b) „ „ „ 22° C	M III b	
c) „ „ „ 12° C	M III c	
5. Wirkung von Kleie I 1 auf frische Konsummilch:		
a) Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M IV a	Serie VIII.
b) „ „ „ 22° C „	M IV b	
c) „ „ „ 12° C „	M IV c	
6. Wirkung von Kleie I 2 auf frische Konsummilch:		
a) Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M V a	Serie IX.
b) „ „ „ 22° C „	M V b	
c) „ „ „ 12° C „	M V c	
7. Wirkung von Kleie I 3 auf frische Konsummilch:		
a) Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M VI a	Serie X.
b) „ „ „ 22° C „	M VI b	
c) „ „ „ 12° C „	M VI c	

V. **Zusammenfassung der Hauptergebnisse.**

I. Untersuchung der frischen Kleie A.

Am 10. März 1909, also 8 Tage nach dem Anlegen der Kulturen, erfolgte die Untersuchung der Platten und hohen Schichten nach den im allgemeinen Teile niedergelegten Grundsätzen. — Nachfolgend die übersichtliche Zusammenstellung der Ergebnisse:

Flora quantitativ:		
Gesamtzahl auf Gelatineplatten	3,8	Mill. Keime
„ „ Agarplatten	3,3	„ „
„ in hoher Schicht-Kultur	0,6	„ „

Die kombinierte Gesamtkeimzahl, d. h. die Summe der Maximalzahlen der verschiedenen Arten auf den drei Nährböden betrug 4 180 000 pro g Kleie; also eine recht ansehnliche Zahl.

Flora qualitativ:

Bakterienart	Absolute Zahl (Maximalzahl)	%
Bacillus mesentericus	500 000	12
Bacterium fluorescens	980 000	24
Bacterium herbicola aureum	450 000	11
Cf. Gelber Gasbildner[1])	20 000	1
Bacterium lactis aërogenes	30 000	1
Bacterium acidi lactici	600 000	14
Bacillus putrificus coli	10 000	—
Unbekannte Kokken	810 000	19
Nicht verflüssigende unbewegliche Kurzstäbchen	700 000	16
Bacterium coli commune	80 000	2
Gesamtzahl:	4 180 000	100

Es konnten also aus dem frischen Material zehn Bakterienarten isoliert werden, von denen zwei, eine große Kokkenart und ein unbewegliches Kurzstäbchen, nicht mit Sicherheit identifiziert werden konnten. Ebenso war der gelbe Gasbildner nicht in typischer Ausbildung vorhanden. Form und Größe der Stäbchen, sowie Koloniencharakter stimmten zwar mit den in der Literatur gemachten Angaben, aber das Gasbildungsvermögen war sehr stark reduziert.

---

[1]) Dem gelben Gasbildner nahestehend.

Das größte Kontingent in der Flora des frischen Krüsches stellte das Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N. Es ist auch unschwer zu erklären, daß diese Art in der Kleie vorkommt; denn sie ist, wie wir gesehen haben, ein recht häufiger Bewohner der grünen Pflanzen und sobald günstige Existenzbedingungen eintreten, findet dort eine bedeutende Vermehrung statt. Bacterium fluorescens aber zeigt in der vorstehenden Kleieprobe zwei wesentliche Abweichungen von der charakteristischen Ausbildung. So ist das Farbstoffbildungsvermögen bei einer sehr großen Zahl von Keimen verloren gegangen; denn wir fanden viele Kolonien, die in allen Eigenschaften vollständig mit dem Bacterium fluorescens übereinstimmten, aber weder in der Roh- noch in der Reinkultur Farbstoff zu produzieren vermochten. Daneben finden sich aber wieder eine Anzahl Kolonien, besonders bei schwacher Besetzung auf Agarplatten, die mit ganz deutlicher grünlicher Zone umgeben sind. Zwischen dieser Gruppe mit typischem Farbstoffbildungsvermögen und jener, die diese Eigenschaft total eingebüßt hat, gibt es nun zahllose Übergänge in allen Stufen und Schattierungen. Es scheint also, daß Bacterium fluorescens unter Umständen das Farbstoffproduktionsvermögen verhältnismäßig leicht einbüßt.

Außer dem Verluste des Farbstoffbildungsvermögens tritt nicht selten mehr oder weniger ausgeprägt auch eine Unterbindung der Peptonisierungsfähigkeit von Eiweißstoffen ein. Das Bact. fluorescens geht dabei also spontan in die nichtverflüssigende Parallelart des Bacterium putidum (Flügge) L. et N. über. In vorstehender Probe sind auch die Kokken in recht bedeutender Zahl vertreten. Sie erweisen sich aber, wie gewöhnlich, als mehr oder weniger latenter Natur und eine eingehendere Bestimmung der aufgetretenen Arten schien daher nicht von besonderer Bedeutung.

Ein fast ständiger Bewohner der Kleie ist das Bacterium herbicola aureum Burri et Düggeli, das in Probe A zwar nur in einer relativen Zahl von 11 Proz. vorkam, aber sich in ganz typischer Form der Zooglöenbildung präsentierte. Endlich ist von besonderer Bedeutung die relativ große Zahl der Gasbildner. Wenn auch die Mehrzahl der Individuen das intensive Gasbildungsvermögen während des langen latenten Lebensstadiums, wo ein günstiges Nährsubstrat mangelte, ziemlich eingebüßt haben, so erwiesen sich doch die Nachkommen derselben bei Überimpfung in Traubenzuckerbouillon oder in Traubenzuckeragar-Schüttelkultur bezüglich der genannten Eigenschaft als leicht regenerationsfähig. Das Gasbildungsvermögen steigerte sich in der Regel bei den späteren Generationen, wie Versuche mit der Coli-aërogenes-Gruppe zeigten, bis zu bedeutender Intensität.

II. Untersuchung der gärenden Kleie.

Am 3. März 1909 wurden sechs Portionen zu je 40 g von der frischen Kleie A in sterile Bechergläser abgewogen, mit je ca. 80 g sterilem Wasser befeuchtet, gut durchmischt und drei der mit abgeflammtem Metalldeckel bedeckten Gefäße zu 37° C gestellt, die anderen drei bei 22° C in Gärung belassen. Über nähere Bezeichnung der Proben, Gärdauer usw. siehe p. 23. Die drei bei 37° C aufbewahrten Proben bilden zusammen die

Serie I.

Gärende Kleieproben Ia, Ib und Ic.

Nach Verlauf von 24 bzw. 48 Stunden bzw. 5 Tagen gelangten die Proben zur Untersuchung, indem die dickbreiige Masse tüchtig durchmischt, ein aliquoter Teil, entsprechend 2 g trockenen Materials, abgewogen und wie im allgemeinen Teil auf p. 11 angegeben ist, verarbeitet wurde.

Ergebnisse:

a) Voruntersuchung.

Art der Probe	Kleie Ia 24 Std. bei 37° C	Kleie Ib 48 Std. bei 37° C	Kleie Ic 5 Tage bei 37° C
Verwendete Menge entsprech. 2 g trockenen Materials	5,820 g	5,801 g	5,420 g
Geruch der Probe	Deutlich säuerlich	Stark brenzlich-sauer	Nach erhitztem Heu
Makrosk. Aussehen	Kaum verändert	Braun, Schimmelanflug	Dunkelbraun, wenig Schimmel

b) Mikroskopischer Befund.

α) Der Keimgehalt pro Gramm quantitativ auf den einzelnen Nährböden in Millionen.

Probe	Molkengelatine-platten	Milchzuckeragar-platten	Milchzuckeragar hohe Schicht	Gesamtzahl in Mill.
Kleie I a	11 600	9000	550	12 010
„ I b	430	440	1400	1 808
„ I c	220	425	340	660

β) Keimgehalt qualitativ (Keimzahlen in Millionen pro Gramm).

Bakterienart	Kleie Ia		Kleie Ib		Kleie Ic	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	210	2	10	1	120	18
Bacterium fluorescens	870	7	0,6	—	—	—
Bacterium herbicola aureum	240	2	—	—	—	—
Bacterium coli	560	5	5	—	—	—
Bacterium acidi lactici	4 500	37	390	21	30	5
Bacterium lactis aërogenes	880	7	3	—	—	—
Bacterium Güntheri, normal	700	6	500	28	280	42
Bact. Güntheri, stark schleimbildend	—	—	—	—	130	20
Gelber Gasbildner	3 950	33	—	—	—	—
Bacillus putrificus coli	100	1	900	50	100	15
Gesamtzahlen:	12 010	100	1808,6	100	660	100

Was zunächst die Probe I a betrifft, so stieg die Gesamtkeimzahl innerhalb 24 Stunden von 4 180 000 auf 12 010 Millionen an; also um rund das 2870-fache. Es hat demnach eine ungemein rasche Zunahme stattgefunden. Besonders große Schwankungen lassen sich feststellen bezüglich der Veränderung der:

Einzelnen Arten. Vor allem auffällig, wenn auch nicht unverständlich, ist das rapide Überwuchern der Gasbildner. Sowohl absolut als prozentuell sind dieselben am weitaus raschesten zur Entwicklung gelangt. Während im frischen Material die Coli-aërogenes-Gruppe und der gelbe Gasbildner zusammen mit 730 000 Keimen = 18 Proz. der Gesamtzahl vertreten waren, weist diese biologische Gruppe im 24 Stunden alten, gärenden Krüsch eine Frequenz von nicht weniger als 9890 Millionen Individuen pro Gramm auf, was einem Anteil von 82 Proz. an der Gesamtkeimzahl entspricht. Prozentisch also ist die Zahl der gasbildenden Bakterien insgesamt um rund das 4½-fache, absolut hingegen um reichlich das 13 500-fache angewachsen. Diese riesige Vermehrungsintensität läßt sich zum großen Teile zurückführen auf die für die Gasbildner äußerst günstige Gärtemperatur der Kleie. Bei 37—38° C liegt für die genannte Spaltpilzgruppe gerade das Optimum.

Außer den Gasbildnern fanden sich noch vier im frischen Material nachgewiesene Arten wieder, nämlich: Bacterium fluorescens, Bac. mesentericus, Bacterium herbicola aureum und der anaërobe Bac. putrificus coli Bienstock. — Alle diese vier Arten haben sich, absolut betrachtet, ganz bedeutend vermehrt; relativ aber sind die drei erstgenannten sehr stark zurückgetreten. Am empfindlichsten hat unter den neuen Verhältnissen das Bacterium fluorescens gelitten. Wohl vermochte sich diese Art von 980 000 auf 870 Millionen, also um ca. das 900-fache zu vermehren, relativ jedoch ist Fluorescens von 24 auf 7 Proz. zurückgegangen. Für diese Art war die Temperatur entschieden zu hoch und die meisten Kolonien hatten das Farbstoffbildungsvermögen eingebüßt; viele zeigten Involutionsformen.

Bacillus mesentericus und Bacterium herbicola aureum verhielten sich ungefähr wie das Bact. fluorescens. Sie zeigten einen relativen Rückgang von 12 resp. 11 auf 2 Proz. Eine ziemlich starke Förderung dagegen hat Bacillus putrificus erfahren. Dieser für den tierischen Organismus nicht unbedenkliche Fäulniserreger hat sich ungefähr im gleichen Verhältnis wie die Gasbildner vermehrt. Die Keimzahl stieg von 10000 im frischen auf 100 Millionen Keime pro Gramm im gärenden Material und erreichte nun im letzteren 1 Proz. des Bakteriengehaltes.

Ganz unterdrückt wurden die nicht verflüssigenden, fluorescens-ähnlichen Stäbchen, die, wie wir vermuten, nichts anderes als degenerierte Formen von Bacterium fluorescens oder von Bacterium putidum waren und nun die neuen, für sie ungünstigen Lebensbedingungen nicht mehr zu überstehen vermochten. — Ebenso war die ehemals mit 19 Proz. vertretene Gruppe der Kokken ganz verschwunden. Neu, wenn vorläufig auch nur in bescheidenem Maße aufgetreten, ist das Bacterium Güntheri L. et N., das mit 700 Millionen pro Gramm etwa 6 Proz. der gesamten Keimzahl erreicht hat. Sowohl quantitativ als qualitativ große Verschiedenheiten zeigen die Proben

Kleie Ib und Kleie Ic. Schon im makroskopischen Aussehen traten bedeutende Abweichungen zutage. Probe Ib zeigte gegenüber Probe Ia einen deutlich brenzlichen Geruch, während die mit Salzsäure entstehenden starken Ammoniakdämpfe der Kleie Ic darauf hinwiesen, daß während der 5-tägigen Gärung schon bedeutende Umsetzungen im Substrat stattgefunden hatten.

In bezug auf die Gesamtkeimzahl wies das 2 Tage alte Material gegenüber dem 24-stündigen eine rasche Abnahme der lebensfähigen Keime auf.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Im Verlaufe des zweiten Gärtages sank nämlich die Bakterienzahl, auf 1 g trockenes Material berechnet, von 12 010 auf 1808,6 Millionen herab. Die Abnahme beträgt demnach 85 Proz. Während drei weiteren Tagen ging auch diese Zahl noch recht bedeutend zurück. Am Ende des fünften Tages konnten pro Gramm nur noch 660 Millionen Spaltpilze nachgewiesen werden; also kaum mehr 5 Proz. der nach 24 Stunden vorhandenen Menge.

Im befeuchteten Krüsch findet also vorerst eine äußerst rasche Keimzahlvermehrung statt. Aber schon nach 24 Stunden scheint der Höhepunkt der Vermehrungsintensität bereits erreicht zu sein und nun vermindert sich die Keimzahl vorerst in raschem Tempo; zwischen dem zweiten und fünften Tage aber macht die energisch sich geltend machende rückläufige Bewegung einer mäßig raschen, aber doch stets fortschreitenden Bakterienabnahme Platz.

Was nun die einzelnen Arten betrifft, so kann ein durchgreifender Wechsel in der Flora festgestellt werden. Die qualitative Zusammensetzung zeigt ein von der Ursprungsflora ziemlich abweichendes Bild. Von den in der frischen Kleie vorhandenen Arten sind in Probe I b noch in spärlichen Trümmern vorhanden: Bacterium fluorescens, Bacillus mesentericus, Bacterium lactis aërogenes und Bacterium coli. Von den Gasbildnern kommt in bedeutender Menge nur noch Bacterium acidi lactici vor, das absolut von 600 000 Keimen pro Gramm auf 390 Millionen, relativ von 14 auf 21 Proz. anwuchs. Zu noch viel bedenklicheren Zahlen entwickelte sich in hoher Schicht der gemeine Fäulniserreger Bacillus putrificus coli, der es aus bescheidenen Anfängen von 10 000 Keimen pro Gramm auf 900 Millionen brachte, also eine absolut ums 90 000-fache vermehrte Vertretung aufwies. Trotzdem dieser für die normale Darmfunktion eventuell gefährliche Bacillus in den konzentrierteren Verdünnungen wegen des säurebildenden Bact. Güntheri sich kaum bemerkbar zu machen vermochte, entwickelte er sich in den schwächeren Verdünnungen, wo das Milchsäurebakterium nicht oder nur spärlich mehr vertreten war, zu der weitaus vorherrschenden Spezies.

Während der Dauer der Gärung neu aufgetreten ist nur das eben genannte Bact. Güntheri L. et N., das in der 5 Tage alten Probe entschieden die Oberhand gewann. Diese Art erreichte hier 62 Proz. des Gesamtgehaltes, während Bacillus putrificus coli von 50 auf 15 Proz. zusammenschmolz. Dank einer vermehrten Säurebildung wurden alle vegetativen Keime von Putrificus vermehrungsunfähig gemacht und sehr wahrscheinlich nur noch die im 2 Tage alten Material in Sporenform vorhandenen Individuen vermochten sich lebenskräftig zu erhalten. Immerhin ist Bac. putrificus noch mit 15 Proz. vertreten. — Auch das Bacterium acidi lactici scheint mit dem zweiten Tage den Höhepunkt seiner Entwicklung erreicht zu haben. Diese Art ging von 390 auf 30 Millionen zurück und war damit im 5 Tage alten Krüsch nur mehr mit 5 Proz. vertreten, gegenüber mit 37 Proz. im 24-stündigen und mit 21 Proz. im 48 Stunden alten Material. Dagegen ist Bacillus mesentericus, der besonders auf den Agarplatten, wo Bact. Güntheri eher zurücktrat, zum Vorschein kam, von 1 auf 18 Proz. angewachsen.

Eine merkwürdige Erscheinung zeigt sich bei Kleieprobe I c. Hier trat nämlich ein typisches Bact. Güntheri mit Schleimproduktion auf. Wir haben den Organismus in Reinkultur etwas näher verfolgt. Das Wachstum auf Molkengelatine ist ganz gut; oft entstehen Kolonien mit einem Durchmesser bis 1 mm. Alle Eigenschaften, mit Ausnahme eines bedeuten-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

den Schleimbildungsvermögens stimmen genau mit dem typischen Bact. Güntheri überein. Die Doppelstäbchenform blieb auch nach vielen Generationen konstant erhalten, Bewegung konnte nie beobachtet werden; dagegen zeigte sich üppige Schleimbildung. Übrigens wurde die Erscheinung, daß Organismen aus der Gruppe der Milchsäurebildner Schleim produzieren, schon von Burri und Alemann (22), sowie von Burri und Thöny [1]), freilich unter anderen Verhältnissen, beobachtet und eingehend studiert.

Serie II.

Gärende Kleieproben I1, I2 und I3.

Diese Serie besteht aus Kleieproben, die angefeuchtet bei 22° C während 24 resp. 48 Stunden resp. 5 Tage in Gärung waren.

Untersuchungsresultate:

a) Voruntersuchung.

Art der Probe	Kleie I 1 24 h bei 22° C	Kleie I 2 48 Std. bei 22° C	Kleie I 3 5 Tage bei 22° C
Verwendete Menge	5,86 g	5,84 g	5,63 g
Makroskop. Aussehen	Noch normal	Bedeut. zersetzt	Stark zersetzt
Geruch	Schwach muffig	Muffig-faulig	Faulig

b) Mikroskopischer Befund.

Probe	Molkengelatine-platten	Milchzucker-agarplatten	Milchzuckeragar hohe Schicht	Gesamtzahl in Mill. pro g
Kleie I 1. . . .	31 000	45 000	11 000	56 000
Kleie I 2. . . .	71 000	65 000	6 700	153 000
Kleie I 3. . . .	49 000	56 000	50 000	60 000

Keimzahlen (In Millionen pro Gramm trockene Kleie).

Bakterienart	Kleie I 1		Kleie I 2		Kleie I 3	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	3 000	5	8 000	5	13 000	22
Bacterium putidum .	—	—	—	—	18 000	30
Bact. lactis aërogenes	7 000	12	2 000	1	5 000	8
Bacterium acidi lactici	32 000	57	61 000	40	6 000	10
Bacterium coli . . .	2 000	4	—	—	—	—
Übergänge der 3 vorig.	—	—	15 000	10	6 000	10
Bact. herbicola aureum	3 000	5	—	—	—	—
Gelber Gasbildner . .	6 000	11	—	—	—	—
Bacterium Güntheri .	—	—	4 000	3	7 000	12
Bacillus putrificus . .	—	—	63 000	41	5 000	8
Kokken unbekannt .	1 000	2	—	—	—	—
Unbek. weiße K. St. (knorpelige Kolonien)	2 000	4	—	—	—	—
Gesamtzahlen	56 000	100	153 000	100	60 000	100

---

[1]) Burri, R., u. Thöny, J., Überführung von normalen, echten Milchsäurebakterien in fadenziehende Rassen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23. 1909. p. 32—41.)

Ein Vergleich vorstehender Tabelle mit jener auf p. 26 zeigt uns sofort, daß der Verlauf der Gärung bei angefeuchteter Kleie ein ganz verschiedener ist, je nachdem die Proben bei 37° C oder aber bei 22° C aufbewahrt werden. Dieses Ergebnis war auch von vornherein zu erwarten. Die Unterschiede äußern sich im wesentlichen im folgenden:

Bei 37° C ist der maximale Gehalt an Bakterien schon nach einem Tage Gärdauer erreicht; denn nach 48 Stunden war die Zahl der Keime pro Gramm bereits auf etwa $^1/_7$ der nach 24 Stunden nachgewiesenen Menge zurückgegangen und bis nach 5 Tagen war nur noch ein bescheidener Rest von kaum 6 Proz. vorhanden. Bedeutend abweichend nun ist der Verlauf der Gärung, wenn die Kleie bei 22° C aufbewahrt wird. Auch hier setzt zwar die Gärung sehr intensiv ein, vor allem gegen Ende des ersten Tages, aber die rapide Keimzahlvermehrung hält auch noch am zweiten Tage an. Ungefähr um diese Zeit wird der Höhepunkt des Bakteriengehaltes überschritten; allein auch die rückläufige Bewegung geht verhältnismäßig nur langsam vor sich, so daß die Zahl der lebensfähigen Mikroorganismen nach 5 Tagen noch nicht bis zu der nach 24 Stunden vorhandenen herabgesunken ist.

Im allgemeinen ist man gewohnt, namentlich wo es sich um die Entwicklung von Gasbildnern handelt, die hier immer in ganz ansehnlicher Zahl vertreten sind, die Temperatur von 37° C als Wachstumsoptimum anzunehmen. Etwas überraschend ist daher vorstehendes Resultat insofern, als nach 24 Stunden die Bakterienzahl bei 22° C 56 000 Millionen betrug, bei 37° C dagegen nach dem gleichen Zeitraum „nur“ 12 010 Millionen, und während im ersteren Falle nach 2 Tagen 153 000 Millionen Keime im Gramm nachweisbar waren, konnten bei 37° C nur 1808,6 Millionen gezählt werden.

In frischer Kleie wurde pro Gramm eine Zahl von 418 Millionen, nach 24 Stunden bei 22° C aber schon 56 000 Millionen Spaltpilze festgestellt. Demnach hat innerhalb dieser kurzen Zeit eine Vermehrung von beinahe ums 13 400-fache stattgefunden. Nach 48 Stunden hat sich dieses Verhältnis auf 1 : 36 600 erweitert. Gegenüber einer so gewaltigen Menge nimmt sich die Keimzahl in den bei 37° C aufgestellten Proben wirklich noch recht bescheiden aus.

Das relative Verhältnis des Bakteriengehaltes in frischem und gärendem Material gestaltet sich, wenn wir die Zahl der in frischer Kleie nachgewiesenen Keime (4,18 Mill.) als 1 annehmen, wie folgt:

Gärtemperatur	Kleie frisch	Verhältnis der Keimzahlen nach		
		24 Std.	48 Std.	5 Tagen
Kleie bei 37° C	1	2 873	433	158
Kleie bei 22° C	1	13 397	36 603	14 354

Tendenzen: Bei 37° C intensives Einsetzen der Gärung, schnelles Ansteigen der Keimzahl, aber frühzeitiger Rückgang derselben.

Bei 22° C sehr intensives Einsetzen der Gärung, längere Dauer und bedeutenderer Umfang derselben; langsame Abnahme der Keimzahl.

In qualitativer Hinsicht hat nicht nur die Temperatur, sondern vor allem auch die Dauer der Gärung einen recht bedeutenden Einfluß auf die Bakterienflora. Vor allem muß hervorgehoben werden, daß die gasbildenden Milchsäurebakterien schon nach 24 Stunden entschieden die Oberhand gewonnen hatten; denn während im frischen Material die Coli-aërogenes-Gruppe 15 Proz., also kaum 1/7 der Gesamtflora betrug, machte sie in dem bei 22° C aufbewahrten, 24 Stunden alten Krüsch, nicht weniger als 73 Proz. aus. Allein die typisch ausgeprägten Coli- und Aërogenes-Arten fanden sich verhältnismäßig sehr spärlich vor. Dagegen ließ sich eine Unzahl von allen nur möglichen Übergängen zu den beiden Endgliedern feststellen.

Um das Material noch vollends zu einem ausgesprochenen Herd von Gasbildnern zu stempeln, tritt noch der in frischer Kleie mit bloß 20 000 Keimen nachweisbare gelbe Gasbildner in der ganz respektablen Zahl von 6000 Millionen auf, so daß damit die Gasbildner allein mit 84 Proz. der Gesamtflora vertreten sind. Recht untergeordnet erscheinen dieser Gruppe gegenüber das Bacterium herbicola aureum und das Bacterium fluorescens. Beide haben sich zwar recht ansehnlich vermehrt, erreichen aber trotzdem bloß je 5 Proz. des gesamten Keimgehaltes. — Nicht mehr nachzuweisen waren im 24 Stunden in Gärung begriffenen Futtermittel Bacillus mesentericus und Bacillus putrificus coli. Die erstere Art scheint die kräftige Säurebildung durch die anderen Arten nicht vertragen zu haben. Bacillus putrificus erreichte erst mit dem zweiten Tage das Maximum seines Vorkommens, indem er eine sehr starke Entwicklung zeigt, trotzdem auch dieser Organismus im allgemeinen die Säure nicht gut verträgt. Wenn von einem mit Bacillus putrificus reich vermengten Futtermittel in der Praxis zufällig nur eine relativ kleine Menge in die Milch gelangt, so könnten unter Umständen für die Konsumenten nicht ganz unbedenkliche Verdauungsstörungen die Folge sein.

Nicht absolut, wohl aber prozentuell sehr stark zurückgegangen sind die Kokken. Sie zeigen eine Abnahme von 19 auf 2 Proz. Ein weißes in knorpeligen Kolonien wachsendes Kurzstäbchen konnte nicht bestimmt werden.

Nach 48 Stunden ist nun auch das Bacterium Güntheri nachweisbar. Diese Art beansprucht bei einer absoluten Zahl von 4000 Millionen bereits 3 Proz. der Gesamtflora. Ganz verschwunden sind die Kokken und das unbekannte, in weißen, knorpeligen Kolonien wachsende Kurzstäbchen. Was speziell die Gasbildner der Coli-aërogenes-Gruppe betrifft, so ist ihre Zahl zwar von 41 000 Millionen auf 78 000 Millionen gestiegen; relativ aber ist die Gruppe von 73 auf 51 Proz. zurückgegangen. Das Bacterium fluorescens zeigt eine zunehmende Vertretung. Vom ersten auf den zweiten Tag stieg dieser Nichtsporenbildner von 3000 auf 8000 Millionen und am Ende des fünften Tages hatte er mit seiner Parallelart, dem nichtverflüssigenden Bacterium putidum sogar 52 Proz. des gesamten Keimgehaltes erreicht. Besonders auffallend ist das explosionsartige Auftreten des Bacillus putrificus, der mit 63 000 Millionen = 41 Proz. in der 2 Tage lang der Gärung ausgesetzten Kleie an erster Stelle steht. Die Verfütterung dieses Futtermittels dürfte tierhygienisch sehr bedenklich sein.

Sehr bemerkenswert ist, daß das Bacterium putidum erst nach 5 Tagen, dann aber in sehr großer Menge nachgewiesen werden konnte. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist dieses speziell im gärenden Krüsch vorhandene Bacterium putidum gar nichts anderes, als eine sprungweise Veränderung, eine Mutation des Bact. fluorescens. Ganz ähnliche Erscheinungen konnten übrigens beobachtet werden an Bact. lactis aërogenes. Eine ganz typische Kolonie dieses Gasbildners mit bedeutendem Abstand der einzelnen Stäbchen verlor nach dreimaliger Überimpfung auf künstlichem Nährboden (Milchzuckeragar-Strich) total das Schleimbildungsvermögen und war vom Bacterium acidi lactici nicht mehr zu unterscheiden. Daher scheint es uns nun auch erklärlich, wenn wir im Laufe der Untersuchungen öfters in den Fall kamen, Übergänge zwischen dem Bacterium coli und dem Bacterium acidi lactici einerseits und vom Bacterium acidi lactici zum Bacterium lactis aërogenes anderseits festzustellen.

Ziemlich rasch wurde vom zweiten auf den fünften Tag der Bacillus putrificus coli unterdrückt, indem er von 41 auf 8 Proz. zurückging. Umgekehrt vermochte das Bacterium Güntheri, ein ausgesprochener Antagonist vom Bacillus putrificus, nun von 3 auf 12 Proz. heranzuwachsen.

Wir haben also gesehen, daß in den bei 22° C aufbewahrten Proben ganz ähnlich, wie dies bei Probe I a, I b und I c der Fall war, während der Gärung ein beständiger Wechsel in der Flora, sowohl quantitativ als auch qualitativ festgestellt werden kann, daß der Gärungsprozeß demnach ein ununterbrochener, wohl metabiotischer Vorgang darstellt.

Serie III.

Untersuchung der für die Impfung mit Kleie (Probe Ia bis und mit I3) verwendeten frischen Konsummilch und der 3 Kontrollmilchproben.

Vorerst wurde die Flora der zu den Impfversuchen benutzten Konsummilch selbst ermittelt. Dann wurden auch 3 Kontrollproben von Milch, bei jenen 3 verschiedenen Temperaturen aufgestellt, welchen die mit frischer und gärender Kleie geimpften Proben ausgesetzt waren, um auf diese Weise auch die Mikroflora bei der normal verlaufenden Milchveränderung zum Vergleiche mit den geimpften Proben heranziehen zu können. Die Konsummilch wurde als Milch a bezeichnet.

Wir geben hier zuerst die Untersuchungsergebnisse von der frischen Konsummilch selbst; es enthielten

Gelatineplatten	200 000	Kolonien	Gesamtzahl = **288 000** Keime pro ccm Milch.
Agarplatten	180 000	„	
hohe Schicht	3 000	„	

Qualitative Ergebnisse (Maximalzahlen auf den einzelnen Nährböden).

Bakterienart	Zahl der nachgewiesenen Keime pro ccm der Milch a	
	absolut	in %
Bacillus mesentericus	20 000	7
Bacillus subtilis	10 000	4
Bacterium fluorescens	10 000	4
Bacterium putidum	30 000	10
B. coli	8 000	3
Bacterium acidi lactici	40 000	14
Langsam verflüssigende Kokken	80 000	28
Nicht verflüssigende Kokken	90 000	30
Total	**288 000**	**100**

Die Flora der Kontrollproben.

Vorprüfung.

Art der Probe und kurze Bezeichnung	Kontrollprobe a KM a	Kontrollprobe b KM b	Kontrollprobe c KM c
Aufbewahrungstemperat.	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makroskop. Veränderung	24 Std.	48 Std.	5 Tage
Aussehen	locker gallertig geronnen, schwach Gas	fest gallertig geronnen, schwach ranzig	feinflockig geronnen, ranzig-säuerlich
Säuregrad	11,4 n/10 NaOH[1]	19,2 n/10 NaOH	12,5 n/10 NaOH

Die Keimzahlen im allgemeinen (Zahlen in Millionen pro ccm).

Kurze Bezeichnung der Proben	Molkengelatineplatten	Milchzuckeragarplatten	Milchzuckeragar hohe Schicht	Gesamtzahl
KM a	9	9	16	26
KM b	2500	2300	3200	3640
KM c	1170	2000	1000	1569

Qualitative Keimzahlbestimmung der Kontrollproben (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	Kontrollprobe a		Kontrollprobe b		Kontrollprobe c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	1	4	—	—	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	60	1	10	1
Bacterium putidum	—	—	100	3	—	—
Bacterium coli	—	—	20	1	9	1
Bacterium acidi lactici	5	19	500	14	110	7
Bacterium lactis aërogenes . .	3	12	60	1	30	2
Nicht verflüssigende Kokken. .	1	4	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	16	61	2900	80	1410	89
Total	**26**	100	**3640**	100	**1569**	100

Die Vorprüfung bezog sich im wesentlichen auf die Feststellung des makroskopischen Aussehens. Was zunächst die frische Milch anbetrifft, so wies dieselbe einen ziemlich hohen Bakteriengehalt auf. Doch gehörte die Großzahl der Keime den gegenüber der Milch in der Regel sich mehr oder weniger latent verhaltenden Kokkenarten an. Die Milch war im übrigen reinlich gewonnen und hielt sich 48 Stunden bei ungefähr 20° C ohne zu gerinnen.

Die Probe bei 37° zeigte nach 18 Stunden bereits den Beginn einer schwachgallertigen, lockeren Gerinnung und nach 24 Stunden war das Koagulum in einer zusammenhängenden, flockig-gallertigen Masse ausgeschieden. Zwischen Rahmschicht und Gerinnsel zeigte sich eine ziemlich scharf begrenzte, schmale Serumzone. Eine spärlich vorhandene Zahl kleiner Gasbläschen deutete auch auf die Anwesenheit von Gasbildnern hin.

Die Milch bei 22° C war nach 48 Stunden fest gallertig geronnen und alle Anzeichen sprachen für Vorhandensein einer guten Milch; denn das Bild der Gerinnung entsprach genau dem, wie man es für die Emmentalerkäsefabrikation wünscht. Anzeichen von Gasbildung waren nur schwach vorhanden; jedoch war die Rahmdecke ziemlich stark gelblich verfärbt und der etwas ranzige Geruch deutete auf Bacterium fluorescens hin. Der sehr hohe Säuregrad von 19,2, sowie das Gerinnungsbild ließen mit ziemlicher Sicherheit das Bacterium Güntheri als Hauptvertreter erwarten, was denn auch alsbald durch das mikroskopische Bild bestätigt wurde.

---

[1] Hinsichtlich der Art und Weise der Bestimmung des Säuregrades in Milch siehe p. 14.

Die Kontrollprobe, die bei 12° C aufgestellt war, zeigte erst nach 4½ Tagen irgendwelche Anzeichen einer makroskopischen Veränderung. Nach 5 Tagen war die Milch ganz feinflockig geronnen. Unter der deutlich gelblich verfärbten Rahmdecke, die einen intensiven ranzigen Geruch angenommen hatte, war eine unscharf abgegrenzte, weißlich-gelbliche Serumzone sichtbar. Der Geschmack der Milch war deutlich bitter; der Säuregrad nur 12,5 ccm n/10 NaOH.

Keimzahlen: Der Keimgehalt der Milch betrug nach 24 Stunden bei 37° C 26 Millionen pro Kubikzentimeter. Er war also gegenüber dem der frischen Milch um ungefähr das 90-fache gestiegen. Die bei 22° aufgestellte Probe jedoch wies nach 48 Stunden eine Bakterienzahl von 3640 Millionen auf. Die Vermehrung war also eine sehr starke. In der bei 12° C aufgestellten Milch konnten nach 5 Tagen 1569 Millionen Keime pro Kubikzentimeter nachgewiesen werden. — Die Untersuchungsergebnisse der Kontrollproben beweisen, daß sich die Milch bei 37° C makroskopisch am raschesten verändert, bei 22° C jedoch eine bedeutend höhere Keimzahl zustande kommt.

In der frischen Milch finden wir als Hauptvertreter — in Übereinstimmung mit Burri, v. Freudenreich und anderen — teils langsam verflüssigende, teils nicht verflüssigende Kokken, die in unserm Falle 58 Proz. der gesamten ursprünglichen Keimzahl beanspruchen. Diese Kokken können jedoch in der aseptisch gewonnenen Milch nachgewiesenermaßen bis zu 90 Proz. des Bakteriengehaltes ansteigen. — Von verflüssigenden Stäbchen sind 3 in der Natur sehr häufig vorkommende Arten vertreten, nämlich Bacillus mesentericus, Bacillus subtilis und Bacterium fluorescens. Das Vorkommen dieser 3 Arten, die sowohl auf den Futtermitteln als auch in der Stalluft öfters nachgewiesen wurden, ist leicht erklärlich. — Auch die Gasbildner finden wir in der frischen Konsummilch schon in bedeutender Vertretung. Die Coli-Acidi lactici-Gruppe umfaßte im vorliegenden Falle in der kaum eine Stunde nach der Gewinnung untersuchten Milch schon 48 000 Keime oder 17 Proz. des Gesamtbestandes.

Ein von der frischen Milch stark abweichendes Bild zeigt die Mikroflora der Kontrollproben. Vor allem bemerkenswert ist die sehr rasche Zunahme des Bacterium Güntheri, das sich in der Probe KM a schon nach 24 Stunden mit 61 Proz. zum Hauptvertreter emporgeschwungen hatte, während Güntheri doch in der frischen Milch nicht nachweisbar war. Der prozentuelle Anteil von Bact. Güntheri stieg bei Kontrollmilch b auf 80 und bei KM c sogar auf 89 Proz.

In der bei 37° C aufgestellten Milch vermochten sich sowohl die Kokken als auch ein Vertreter der Peptonisierenden, der Bacillus mesentericus noch knapp zu erhalten, während die gasbildenden Milchsäurebakterien, die sich als beinahe ständige Bewohner frischer Konsummilch in größerer oder kleinerer Zahl vorfinden, bereits ein Kontingent von 31 Proz. der Gesamtflora stellen. Bei 22° C kamen das Bact. fluorescens und Bact.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

putidum spärlich zur Entfaltung. Die Vertretung beträgt nur 4 Proz. Infolge des raschen Überhandnehmens der Milchsäurebakterien wurde der Entwicklung dieser säurefliehenden Organismen ein energisches Halt geboten. Die Gasbildner sind in Probe KMb trotz der absolut bedeutenden Zahl von 580 Millionen pro Kubikzentimeter doch nur mit 16 Proz. vertreten, während das Bacterium Güntheri L. et N. mit 80 Proz. alle anderen Arten weit überholte. Ein relativ noch stärkeres Übergewicht erlangt der genannte Organismus in der bei 12° C aufbewahrten Milch, da er hier 89 Proz. der Keimzahl beansprucht. Den Rest nehmen fast ausschließlich die schon in den beiden andern Proben verhältnismäßig stark vertretenen Gasbildner in Anspruch. Wir werden später bei Vergleich dieser Kontrollmilchen mit den geimpften Proben noch ausführlichere Erörterungen über das bezügliche Verhältnis anknüpfen.

Serie IV.

Einwirkung frischer Kleie auf frische Konsummilch.

3 Proben der frischen Konsummilch von 100 ccm wurden in je einem 150 ccm fassenden Erlenmeyerkölbchen mit je $^1/_{100}$ g der frischen, mit sterilem Wasser zu einem feinen, dünnflüssigen Brei zerriebenen Kleie A geimpft; die geimpften Milchproben wurden zu 37° C, 22° C resp. 12° C gestellt.

Untersuchungsresultate:

a) Vorprüfung.

Art der Probe	Frische Konsummilch geimpft mit frischer Kleie A		
Aufbewahrungstemperat.	37° C	22° C	12° C
Kurze Bezeichnung	M I	M II	M III
Zeit bis zur Untersuchg.	24 Stunden	48 Stunden	5 Tage
Makr. Aussehen Geruch Geschmack	gallertig geronnen, schwache Gasbildg., säuerlicher Geruch, Geschmack normal-säuerlich	gallertig geronnen, Spuren von Gas, Geruch etwas ranzig, Geschm. rein sauer	feinflockig-gallertig geronnen, Geruch säuerlich-ranzig, Geschmack säuerl.-bitter
Säuregrad	7,8 n/10 NaOH	15,5 n/10 NaOH	14,7 n/10 NaOH

Das mikroskopische Bild eines direkt aus dem Erlenmeyerkölbchen entnommenen Tröpfchens Milch zeigte bei M I ca. ⅔ Güntheriformen, zu 2 und in längeren Kettchen und ca. ⅓ längere Stäbchen. M II wies weit überwiegend typische Zweiergüntheriformen auf, ebenso M III.

b) Gesamtkeimzahlen (in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Maximal-zahlen
M I	25	24	14	33
M II	1200	1400	270	1590
M III	1080	1900	200	2210

c) Die Flora im speziellen (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I		M II		M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	30	2	90	4
Bacterium coli	2	6	50	3	20	1
Bacterium acidi lactici	9	27	90	6	100	5
Bacterium Güntheri	21	64	1400	88	2000	90
Kokken	1	3	—	—	—	—
Bacillus putrificus coli	—	—	20	1	—	—
Gesamtzahl	33	100	1590	100	2210	100

Ziehen wir zuerst einen Vergleich zwischen der Flora der mit frischer Kleie geimpften Milch und der Flora der frischen Kleie selbst. Im frischen Krüsch wurden 10 Bakterienspezies nachgewiesen, von denen 4 Arten mit den in der geimpften Milch gefundenen identisch sind, nämlich Bacterium fluorescens, Bacterium acidi lactici, Bacterium coli und Bacillus putrificus. Die in der Probe M I vorkommende Kokkenart scheint von jener in der frischen Kleie gefundenen etwas abzuweichen. Durch die Impfung der Proben M I, M II und M III mit je $^1/_{100}$ g frischer Kleie wurden in 100 ccm Milch quantitativ übertragen:

Von Bacterium fluorescens	9800	Keime,	auf 1	ccm	Milch	also	98	Keime
„ Bacterium acidi lactici	6000	„	„ 1	„	„	„	60	„
„ Bacterium coli	800	„	„ 1	„	„	„	8	„
„ Bacillus putrificus	100	„	„ 1	„	„	„	1	Keim.

Rechnen wir zu diesen Zahlen die in der frischen, zur Impfung benutzten Milch schon ursprünglich vorhandenen Bakterien, nämlich von

Bacterium fluorescens	10 000	Keime pro ccm
Bacterium coli	8 000	„ „ „
Bacterium acidi lactici	40 000	„ „ „

hinzu, so erhalten wir für die in den Milchproben M I, M II und M III nachgewiesenen Arten pro Kubikzentimeter geimpfter Milch folgende Ausgangszahlen:

Für Bacterium fluorescens	10 098	Keime
„ Bacterium coli	8 008	„
„ Bacterium acidi lactici	40 060	„
„ Bacillus putrificus	1	Keim.

Es haben sich somit während der Zeit von der Impfung bis zur Untersuchung der Milch vermehrt (in ab- und aufgerundeten Zahlen):

	in M I	in M II	in M III
Bacterium fluorescens ums	—	2971-fache	8913-fache
Bacterium coli ums	250-fache	6250 „	2500 „
Bacterium acidi lactici ums	225 „	2246 „	2496 „
Bacillus putrificus ums	—	20 Mill.-fache	—

Während nun diese eben angeführten 4 Arten sich einer bedeutenden Entwicklung erfreuten, sind eine ganze Reihe anderer Spezies entweder von den rasch überhand nehmenden Säureproduzenten in ihrer Entwicklung gehemmt oder direkt zugrunde gerichtet worden. Folgende in frischer Kleie anwesenden Arten kamen in der Milch nicht wieder zum Vorschein:

Bacillus mesentericus	eingeimpft mit	5000	Keimen
Bacterium herbicola aureum	„ „	4500	„
Gelber Gasbildner	„ „	200	„
Bacterium lactis aërogenes	„ „	300	„
Kokken	„ „	8100	„
Nicht verflüssigende unbewegliche Kurzstäbchen	„ „	7000	„

Von diesen 6 Arten vermochte keine zu genügend großer Zahl heranzuwachsen, um in der veränderten Milch nachgewiesen werden zu können. Nur jene Spezies entwickelten sich in bedeutender Menge, denen die neuen Verhältnisse zusagten, vor allem also die gasbildenden Milchsäurebakterien. Durch Übertragung in ein neues Medium, vor allem aber durch eine weitgehende chemische und physikalische Verschiedenheit dieses Nährmediums selbst gegenüber dem früheren griff nach kurzer Zeit eine auffällige Auslese unter den eingesäten und in der Milch schon vorhandenen Spaltpilzarten Platz. Die mächtigste Entfaltung zeigt auch hier, wie fast überall, das Bacterium Güntheri, das in den Proben MI, ca. $^6/_{10}$, in MII und MIII ca. $^9/_{10}$ des ganzen Bestandes erreicht.

Inwieweit vermochte nun aber die Einimpfung von frischer Kleie die natürlichen Gärungsprozesse in der Milch zu beeinflussen? Das erfahren wir, wenn wir die Flora der Kontrollproben mit jener der geimpften Proben vergleichen. Dieser Vergleich sei zuerst betreffend der Gesamtzahlen an Bakterien durchgeführt:

Kontrollproben		Geimpfte Proben		Differenz
KM a	26 Millionen	M I	33 Millionen	+ 7 Millionen
KM b	3640 „	M II	1590 „	— 2050 „
KM c	1569 „	M III	2210 „	+ 641 „

In bezug auf die Gesamtbakterienzahl weist demnach die Kontrollprobe KMa nur eine verhältnismäßig geringe Abweichung gegenüber der geimpften Parallelprobe MI auf; da erstere 26 Millionen, letztere 33 Millionen Keime hat. Die geimpfte Probe ist also um 27 Proz. bakterienreicher. Diese Differenz erweitert sich auf 40 Proz. bei den Proben KMc und MIII. In beiden Fällen ist die geimpfte Milch also keimreicher als die Kontrollprobe. Daß aber nicht etwa die Übertragung einiger hundert Keime durch die geringe Menge frischer Kleie, sondern mehr der Zufall die höhere Keimzahl bewirkte, das beweist der Vergleich zwischen KMb und MII. Die bei 22° C aufgestellte Kontrollmilchprobe ist nämlich viel bakterienreicher, als die geimpfte Parallelprobe. Der Unterschied beträgt volle 56 Proz. Dieses Ergebnis steht daher den 2 übrigen direkt entgegen; es beweist, daß die Einimpfung einer kleinen Menge von frischer Kleie auf die unter normalen Bedingungen stets eintretende Selbstsäuerung der Milch nicht einen bestimmenden Einfluß auszuüben vermag.

Was nun die einzelnen Arten betrifft, so muß eine recht große Übereinstimmung zwischen den entsprechenden Proben bei gleicher Temperatur festgestellt werden. Weitaus das Übergewicht hat in allen Proben, ob geimpft oder ungeimpft, das Bacterium Güntheri L. et N. In den geimpften Milchen war diese Art mit 64, 88 resp. 90 Proz. der gesamten Keime vertreten, während die Kontrollproben die bezüglichen Zahlen von 61, 80 bzw. 89 aufweisen. — Hier ist also unter den obwaltenden Umständen eine sehr gute Übereinstimmung festzustellen. Dem Bacterium Güntheri folgen quantitativ die gasbildenden Milchsäurebakterien und zwar in allen Proben. Diese Gruppe ist vertreten:

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

bei 37° Gärtemperatur: in Probe KM a mit **31** %; in M I mit **33** %
„ 22° „ „ „ KM b „ **16** %; „ M II „ **9** %
„ 12° „ „ „ KM c „ **10** %; „ M III „ **6** %

In beiden Serien nimmt die prozentuelle Vertretung der Gasbildner mit der Temperatur ab. Die geimpften, wie die ungeimpften Proben zeigen hier dasselbe Verhalten.

Endlich ist noch zu erwähnen, daß sich in den Proben bei 22 und 12° in geringer Zahl fluoreszierende Arten vorfanden, während bei 37° C keine nachzuweisen waren. Beiderorts dagegen kommen Kokken, wenn auch in untergeordneter Menge vor. Einzig Bacillus mesentericus ließ sich in den geimpften Milchen nicht mehr nachweisen.

Kurz zusammengefaßt lautet das Ergebnis vorstehender Untersuchung:

Die frische Kleie hat nach unserem Versuche in der Impfmenge von $^1/_{100}$ g pro 100 ccm Konsummilch keine wesentliche Einwirkung auf den Verlauf des in dieser Milch sich abspielenden natürlichen Gärungsvorganges.

Serie V.

Einwirkung von gärender Kleie, die angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war, auf gewöhnliche Konsummilch.

Diese Serie wurde in ganz analoger Weise durchgeführt, wie Serie IV; nur wurden die Milchproben mit gärender Kleie geimpft.

Voruntersuchung:

Kurze Bezeichnung der geimpften Milch	M I a	M I b	M I c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchung	24 Std.	48 Std.	5 Tage
Säuregrad	9,1 n/10 NaOH	15,0 n/10 NaOH	12,5 n/10 NaOH

Makroskopisches Aussehen: Bei MIa gallertige Gerinnung, bedeutende Gasbildung, Geschmack unrein sauer. Bei MIb fest gallertige Gerinnung, schwache Gasbildung, starker, ziemlich rein saurer Geschmack. Bei MIc ist das Bild fast gleich wie bei Kontrollprobe c, Geschmack sauer und bitter.

Gesamtkeimzahlen pro Kubikzentimeter Milch.

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M I a	58 Mill.	80 Mill.	95 Mill.	111 Mill.
M I b	880 „	1570 „	900 „	2430 „
M I c	1475 „	1890 „	2200 „	2980 „

Hinsichtlich qualitativer Zusammensetzung der Mikroflora siehe Tabelle p. 39 oben.

Die nähere Analyse zeigt, wie schon die Vorprüfung vermuten ließ, in der Milch MIa überwiegend Gasbildner. Diese machen 75 Proz. der gesamten Keimzahl aus. Das Bacterium Güntheri vermochte in der Konkurrenz mit den gasbildenden Stäbchen nicht aufzukommen, wodurch es auch dem Bacillus mesentericus ermöglicht wurde, in der nicht so stark angesäuerten Milch zu bedeutender Entwicklung zu gelangen. Die Kokken, die offenbar aus der frischen Konsummilch stammen, vermochten sich noch in bescheidener Zahl zu halten.

Die Flora im speziellen (Keimzahlen in Millionen pro ccm Milch).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	10	9	10	—	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	50	2
Bacterium putidum	—	—	—	—	140	5
Bacterium coli	—	—	50	2	20	1
Bacterium acidi lactici	75	68	550	23	250	9
Bacterium lactis aërogenes . .	8	7	—	—	50	2
Bacterium Güntheri	12	11	1800	74	2470	81
Kokken	6	5	—	—	—	—
Gelbe Rosettenkolonien (Stb.) .	—	—	20	1	—	—
Gesamtzahlen	111	100	2430	100	2980	100

In der Probe bei 22° C ist das Verhältnis zwischen gasbildenden und nichtgasbildenden Milchsäurebakterien genau umgekehrt; rund $^3/_4$ der Flora beansprucht Bacterium Güntheri, den Rest die Gruppe der Gasbildner. Am mannigfaltigsten ist die Flora der Milch bei 12° C zusammengesetzt. Bacterium Güntheri ist weit dominierend, aber bei der niederen Temperatur ist sein Säurebildungsvermögen, wie aus der Vorprobe ersichtlich ist, bedeutend heruntergesetzt. Daher konnten auch die fluoreszierenden Arten, die sehr wahrscheinlich den bitteren Geschmack der Milch bedingen, eine gewisse Bedeutung erringen. Die Coli-Aërogenes-Gruppe beansprucht hier ca. $^1/_8$ der Flora.

Welche Wirkung hat nun die gärende Kleie auf die Flora der Milch ausgeübt?

Während durch die Impfung mit frischem Material in Konsummilch kein wesentlicher Einfluß auf die Zusammensetzung der Milchflora nachzuweisen war, zeigt uns ein Vergleich zwischen den Kontrollmilchproben KM a, KM b, KM c und den Proben dieser Serie recht bedeutende Abweichungen. Es waren aufgetreten:

	Coli-Aërogenes-Gruppe		Bacterium Güntheri	
	absolut	in %	absolut	in %
Bei 37° C				
In Kontrollmilch KM a	8 Mill.	31	16 Mill.	61
In der geimpften Milch M I a . .	83 „	75	12 „	11
Bei 22° C				
In der Kontrollmilch KM b . . .	580 „	16	2900 „	80
In der geimpften Milch M I b . .	600 „	25	1800 „	74
Bei 12° C				
In der Kontrollmilch KM c . . .	149 „	10	1410 „	89
In der geimpften Milch M I c . .	320 „	12	2470 „	81

Aus diesen Zahlen geht deutlich hervor, daß bei allen 3 Temperaturen die Coli-Aërogenes-Gruppe in der geimpften Milch durchweg in bedeutend stärkerer Vertretung vorhanden ist, als in der analogen Kontrollmilch. In den Proben bei 37° C übertrifft das Bacterium Güntheri diese, in der Milchwirtschaft mit Recht so gefürchtete Gruppe der Gasbildner bei der Milch KM a um das Doppelte; bei der Milch M I a aber verhält sich Bacterium Güntheri zu den Gasbildnern ungefähr wie 1 : 7. In der geimpften Milch finden sich unter sonst absolut gleichen Bedingungen bei Bluttemperatur mehr als die zehnfache Menge der in der Kontrollprobe nachweisbaren Gasbildner. Die Impfung oder — was auf dasselbe herauskommt — die Verunreinigung frischer Konsummilch mit gärender Kleie bedingt also nach vorstehenden Ergebnissen nicht nur eine bedeutende Vermehrung des Keimgehaltes dieser Milch, sondern begünstigt besonders auch die Überhandnahme der Gasbildner.

Serie VI.

Einwirkung von Kleieprobe A, die angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war, auf Konsummilch.

Die Herstellung der Proben geschah wie üblich. Die geimpften Proben kamen, wie früher, zu 37, 22 und 12° C und wurden nach 1, 2 resp. 5 Tagen untersucht.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Proben	M II a	M II b	M II c
Aufbewahrungstemperatur . . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchung . .	24 Stunden	48 Stunden	5 Tage
Säuregrad	9,9 n/10 NaOH	14,9 n/10 NaOH	12,5 n/10 NaOH
Makroskopisches Aussehen und Geschmack	käsig-ziegerig geronnen, viel Gas	gallertig geronnen, Gas, normal sauer	Feinflockig geronnen, ähnlich wie KM c, säuerlich, stark bitter.

Gesamtkeimzahlen pro ccm.

Probe	Molkengelatineplatten	Milchzuckeragarplatten	Milchzuckeragar hohe Schicht	Gesamtzahl
M II a	140 Mill.	180 Mill.	780 Mill.	854 Mill.
M II b	820 „	1680 „	800 „	1702 „
M II c	1300 „	1700 „	1100 „	1930 „

Die Flora im einzelnen (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M II a		M II b		M II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	2	—	70	4
Bacterium coli	4	1	—	—	60	3
Bacterium acidi lactici	200	23	250	15	500	26
Bacterium lactis aërogenes . .	600	70	135	8	—	—
Bacterium Güntheri	50	6	1270	74	1300	67
Micrococcus Freudenreichii. . .	—	—	25	2	—	—
Bacillus putrificus coli	—	—	20	1	—	—
Gesamtzahl	854	100	1702	100	1930	100

Schon bei der Vorprüfung erwies sich besonders Probe MII a durch die käsig-ziegerige Gerinnung sehr auffällig und das mikroskopische Bild erschien fast wie eine Reinkultur von Bacterium lactis aërogenes. Die Gesamtkeimzahl zeigte denn auch eine gewaltige Steigerung nicht nur gegenüber der Kontrollmilch, sondern auch gegenüber der Milch MIa. Erstere wurde um rund das 32-fache, letztere um beinahe das 8-fache übertroffen.

Aber auch die Probe MII c weist gegenüber der Kontrollmilch eine ansehnliche Zunahme des Bakteriengehalts auf, wenn auch bei weitem nicht in dem Maße, wie Probe II a.

Auf 1 ccm Milch wurden 180 860 Keime in jede Milchprobe durch die Impfung übertragen (vergleiche Kleie I b, p. 26). Von diesen gehörten 39 800 der Coli-Aërogenes-Gruppe an; 50 000 waren Bacterium Güntheri. In der bei 37° C aufgestellten Probe vorstehender Serie jedoch finden sich volle 94 Proz. Gasbildner; das Bacterium Güntheri beansprucht nur den ganz bescheidenen Rest von 6 Proz. Hier kommt also der Einimpfung von gärender Kleie in Milch eine noch größere Bedeutung zu, als bei Serie V. Bei 37° C haben wir in der Milch beinahe eine Reinkultur von Gasbildnern.

In der Probe MIIb, also bei 22° C, vermochte das nichtgasbildende Milchsäurebakterium über die Gasbildner die Oberhand zu gewinnen. Das prozentuelle Verhältnis ist ungefähr wie 3 : 1, also ähnlich wie in der Probe M Ib der Serie V. — Sehr bemerkenswert ist hier das Auftreten eines großen, verflüssigenden, stark schleimbildenden Kokkus, der sich bei näherer Prüfung als Micrococcus Freudenreichii Guillebeau erwies. Das Vorkommen von Bacillus putrificus scheint auf den ersten Blick etwas überraschend. Aber wenn man bedenkt, daß dieser Fäulniserreger im Impfmaterial mit 50 Proz. der Flora vertreten war, daß er ferner in einer Zahl von 90 000 Keimen pro Kubikzentimeter in die Milch eingesät wurde, so ist es leicht verständlich, daß Putrificus sich trotz der bedeutenden Säurebildung vermehrungsfähig erhalten und nach 48 Stunden — es brauchte ja keine allzu starke Vermehrung — in der hohen Schicht zum Wachstum gelangen konnte.

Verhältnismäßig reich an Gasbildnern ist Probe M IIc. Quantitativ verhalten sich hier Güntheri und Gasbildner ca. wie 67 : 29. Das Bacterium Güntheri trat hier also mehr zurück als in Probe MIIb. Dagegen trat hier, wie dies überhaupt bei fast allen Milchproben bei 12° C beobachtet werden konnte, das Bacterium fluorescens, das den scharfen, bitteren Geschmack hervorrief, auf.

Zusammenfassend können wir sagen, daß auch bei Serie VI die Einimpfung einer kleinen Menge des bei 37° C in Gärung übergegangenen Kleienmaterials einen merklichen Einfluß auf die Bakterienflora der Konsummilch, sowohl quantitativ als qualitativ, ausgeübt hat.

Serie VII.

Einwirkung von Kleieprobe A, die angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war, auf Konsummilch.

Herstellung und Aufbewahrung der Proben wie üblich. Über Beschaffenheit des Impfmaterials siehe Kleie I c p. 26.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M III a	M III b	M III c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchung	24 Std.	48 Std.	5 Tage
Geschmack	ziemlich normal sauer	normal sauer	sauer, deutlich bitter
Säuregrad	7,8 n/10 NaOH	14,0 n/10 NaOH	12,6 n/10 NaOH
Makroskopisches Aussehen	flockig geronnen, viel Gas	schön gallertig geronnen, wenig Gas	schön gallertig geronnen

Die Gesamtkeimzahl pro ccm.

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Total
M III a	350 Mill.	810 Mill.	800 Mill.	867 Mill.
M III b	1300 „	2200 „	1800 „	2820 „
M III c	900 „	1200 „	1200 „	1310 „

Bakterienarten im einzelnen (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M III a		M III b		M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	30	1	20	1
Bacterium putidum	—	—	—	—	30	2
Bacterium coli	11	1	90	3	—	—
Bacterium acidi lactici	350	40	300	11	150	12
Bacterium lactis aërogenes . .	410	47	90	3	—	—
Bacterium Güntheri (z.T. schleimbildend)	70	9	2210	79	1100	84
Fadenziehende Kokken	26	3	100	3	—	—
Bacillus putrificus	—	—	—	—	10	1
Gesamtzahl	867	100	2820	100	1310	100

In den Proben dieser Serie tritt die Milchsäuregärung noch viel ausgesprochener hervor als in den Serien V und VI. Dies ist auch nicht zu verwundern; denn das Impfmaterial barg in überwiegender Menge Spaltpilze der Milchsäure erzeugenden Gruppe. Je weiter also die Gärung im angefeuchteten Kleiematerial fortschreitet, desto entschiedener bekommen die Milchsäurebildner die Oberhand. Zugleich setzen im Impfmaterial aber auch die Eiweiß lösenden Pilze ein. Von Bacillus putrificus waren 15 Proz. nachweisbar. Allein dieser Schädling ging infolge der raschen Zunahme des Säuregehaltes der Milch ziemlich schnell zurück und ließ sich in vorstehender Serie nur in der bescheidenen Menge von 1 Proz. und nur in Probe III c nachweisen. In Probe III a und III b, wo die Säuerung viel rascher vor sich ging, vermochte Putrificus gar nicht aufzukommen.

Sehr wechselnd ist in den einzelnen Proben dieser Serie die Vertretung der 3 verschiedenen Typen der gasbildenden Milchsäurebakterien. Im Impfmaterial ließ sich von der Coli-Aërogenes-Gruppe nur das Bacterium acidi lactici nachweisen und zwar mit 5 Proz. der Gesamtflora. In Probe III a ist dieser Organismus mit 40 Proz., in III b mit 11 Proz. und in III c mit 12 Proz. vertreten. Daneben tritt nun aber, besonders bei 37° C, das typische Bacterium aërogenes in großer Zahl auf; bei 22° C ist die Frequenz dagegen eine ganz bescheidene, bei 12° C fehlt Bact. aërogenes ganz. Wie erklärt sich diese Erscheinung? Der Grund liegt in erster Linie bei der Temperatur. Bei 37° kann die reichliche Schleimbildung am besten vor sich gehen. Doch ist auch der Fall möglich, daß Bact. aërogenes in Bacterium acidi lactici übergeht. Die Art verliert einfach das Vermögen der Schleimbildung und erscheint dann bei den niederen Temperaturen unter der Flagge des Bacterium acidi lactici. Wir hatten schon wiederholt Gelegenheit, diese Erscheinung durch Überimpfen des Organismus auf künstlichen Nährböden zu beobachten. Außer der

Temperatur wirkt bei der Schleimbildung sehr wahrscheinlich auch der Nährboden entscheidend auf den Vorgang der Schleimkapselbildung.

Recht auffällig ist in vorstehender Probe auch besonders das Auftreten von schleimbildenden Güntheriformen. Diese wurden zwar schon im Impfmaterial in bedeutendem Maße nachgewiesen, scheinen aber dort nur unter abnormalen Verhältnissen bei 12° C in beschränkter Zahl vorzukommen. Bemerkenswert ist endlich, daß das Bacterium fluorescens dieser Serie, wenn es vom natürlichen Substrat auf künstliche Nährböden übertragen wird, ziemlich leicht sein Verflüssigungsvermögen verliert und dann als Bacterium putidum erscheint. Es ist uns sogar gelungen, diese Mutation direkt zu beobachten.

Serie VIII.

Einwirkung von gärender Kleieprobe A, die angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war, auf Konsummilch.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich. Über die Flora des Impfmaterials siehe p. 29 Kleie I 1.

Untersuchungsergebnisse:

Vorprüfung.

Gärdauer und Gärtemperatur	24 Std. b. 37° C	48 Std. b. 22° C	5 Tage b. 12° C
Kurze Bezeichnung der Proben	M IV a	M IV b	M IV c
Geschmack der Milch	unrein säuerlich	normal sauer	Säuerlich, Stich ins Bittere
Säuregrad	10,5 n/10 NaOH	15,3 n/10 NaOH	11,3 n/10 NaOH
Makroskopisches Aussehen	feinflockig geronnen, viel Gas	typ. gallertig geronnen	feinflockig geronnen, schwach Gas

Gesamtkeimzahl (in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamtzahl
M IV a	98 Mill.	130 Mill.	700 Mill.	712 Mill.
M IV b	1800 „	2400 „	1400 „	2430 „
M IV c	1600 „	700 „	500 „	1850 „

Die Flora im speziellen (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IV a		M IV b		M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	—	—	10	1
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	70	4
Bacterium coli	22	3	10	—	50	3
Bacterium acidi lactici	450	63	20	1	200	11
Bacterium aërogenes	200	28	—	—	120	6
Bacterium Güntheri	40	6	2400	99	1400	75
Gesamtzahlen	712	100	2430	100	1850	100

Die Zahl der Spaltpilze in der 24 Stunden bei 37° C aufbewahrten Milchprobe ist ungefähr gleich der Keimzahl der analogen Milchproben M IIa und M IIIa in Serie VI und VII. Dort wurden pro Kubikzentimeter 854 resp. 867 Millionen Spaltpilze gefunden, hier konnten nur 712 Millionen nachgewiesen werden. — Die maximale Bakterienzahl fand sich auch in vorstehender Serie in der Milch bei 22° C (MIV b). Bei dieser Serie wurden die Gasbildner, die in MIVa 94 Proz. der Keimzahl beanspruchen, bei 22 und 12° C vom Bacterium Güntheri sehr stark zurückgedrängt. Dieses ist in MIVb auf volle 99 Proz. herangewachsen, während den Gasbildnern der kleine Rest von nur 1 Proz. verbleibt. Bei 22° C ist also von der Wirkung der Impfung beinahe nichts zu bemerken. Etwas besser vermögen die Gasbildner wieder bei 12° C aufzukommen, was zum Teil auch dem Umstande zugeschrieben werden mag, daß das Bact. Güntheri, das zwar noch den ganz ansehnlichen Teil von 75 Proz. der Flora aufweist, ein herabgemindertes Säureproduktionsvermögen zeigte. Wie früher, so macht sich auch hier die Erscheinung geltend, daß das Bacterium aërogenes mit abnehmender Temperatur sehr stark zurückgeht; bei 22° C wird die genannte Art vom Bacterium Güntheri sogar ganz überwuchert; bei 12° C vermag sie sich in bescheidener Vertretung zu behaupten. — Erwähnenswert ist hier auch, daß von Güntheri, namentlich in Probe MIVb, ganz typische Kurzstäbchen angetroffen wurden. Die ausgesprochene Stäbchenform blieb auch bei der Weiterimpfung auf künstlichen Nährböden zum Teil noch erhalten; ein Teil der Individuen jedoch zeigte nach der ersten Überimpfung schon wieder das bekannte, beidseitig zugespitzte Doppelstäbchen. Diese Beobachtung stimmt auch mit der seinerzeit im landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratorium der eidgen. technischen Hochschule schon von L. Müller[1]) gemachten Entdeckung überein, daß das Bacterium Güntheri L. et N. in ein ganz ausgeprägtes Kurzstäbchen einerseits und in einen von der gewöhnlichen Kokkenform morphologisch nicht zu unterscheidenden Organismus andererseits übergeführt werden kann. — Auch die Serie VIII bestätigte im allgemeinen wieder die Tatsache, daß das Impfmaterial nicht eine ausschlaggebende Wirkung auf die Flora der bei gewöhnlicher Temperatur aufgestellten Milch auszuüben vermag, bei 37° C jedoch ein deutlicher Einfluß wahrzunehmen ist.

Serie IX.

Einwirkung von Kleieprobe A, die 48 Stunden bei 22° C in Gärung war, auf gewöhnliche Konsummilch.

Das Impfmaterial für diese Serie zeigte nach 48 Stunden eine schwachbräunliche Verfärbung; der Geruch war faulig-muffig; die gut nachweisbare Ammoniakentwicklung deutete darauf hin, daß auch schon die Eiweißzersetzung begonnen hatte. Schimmelbildung war makroskopisch noch kaum wahrnehmbar. Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Milchproben erfolgte auf die Art und Weise wie sie im allgemeinen Teil beschrieben wurde.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M V a	M V b	M V c
Aufbewahrungstemperat.	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchg.	24 Std.	48 Std.	5 Tage
Geschmack	unrein säuerlich	normal sauer	säuerlich-bitter
Säuregrad	10,4 n/10 NaOH	15,0 n/10 NaOH	11,1 n/10 NaOH
Makroskop. Aussehen	feinflockig geronnen, deutliche Gasproduktion	gallertig geronnen, etwas Gas	feingallertig geronnen

---

[1]) Müller, Leo, Vergleichende Versuche über Milchsäurebakterien (des Typus Güntheri) verschiedener Herkunft nebst Beitrag zur Frage der Stellung dieser Organismen zu den typischen Streptokokken. [Dissert.] (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 17. p. 468 ff.)

Gesamtkeimzahlen pro ccm Milch.

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Maximal-zahlen
M V a	160 Mill.	170 Mill.	80 Mill.	180 Mill.
M V b	800 „	1800 „	1200 „	1960 „
M V c	1100 „	600 „	50 „	1160 „

Die Flora im einzelnen (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	—	—	10	1
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	10	1
Bacterium coli	10	6	—	—	30	2
Bacterium acidi lactici	60	33	140	7	70	6
Bacterium aërogenes	90	50	20	1	40	3
Bacterium Güntheri	20	11	1800	92	1000	87
Total	180	100	1960	100	1160	100

Die Proben V a und V b enthalten absolute Reinkulturen von Milchsäurebakterien. Wie in allen Proben bei 37° C, so haben auch bei M V a die gasbildenden Spaltpilze weitaus die Oberhand. Sie machen 89 Proz. der Flora aus, während das typische Bacterium Güntheri nur in einer Vertretung von 11 Proz. nachweisbar war. Quantitativ findet sich im allgemeinen bei dieser Probe eine recht bescheidene Spaltpilzmenge vor, „nur“ 180 Millionen pro Kubikzentimeter Milch, während die analoge Zahl in den vorhergehenden Proben das 4—5-fache beträgt.

In der bei 22° C belassenen Milchprobe ist das Bacterium Güntheri wieder siegreich aus dem Kampfe mit den Gasbildnern hervorgegangen und das Verhältnis zwischen den Gasbildnern und Nichtgasbildnern ist beinahe ein umgekehrtes von Probe Va (8 : 92 gegen 89 : 11). Die Milchprobe, die 5 Tage bei 12° C in Gärung war, weist neben den beiden Gruppen der Milchsäurebakterien, die auch hier die Hauptflora bilden, in schwacher Vertretung auch Bacterium fluorescens auf, das sich in der Regel einstellt, sobald die Milch längere Zeit bei niedriger Temperatur belassen wird. Ferner ließ sich auch Bacillus mesentericus in untergeordneter Zahl nachweisen. Dieser Sporenbildner war in ganz bedeutender Menge an der Oberfläche des Impfmaterials als gelblich-bräunliche, stark fadenziehende Masse üppig entwickelt und ließ sich durch direkte Abimpfung auf Kartoffel ganz leicht identifizieren.

Bemerkenswert ist, daß die Flora der Milchproben dieser Serie eine ziemlich abweichende von jener der frischen Milch ist. So sind z. B. ganz verschwunden Bacillus subtilis, Bacterium putidum und die ganze Menge der Kokken, die in der frischen Milch mit 58 Proz. an der Mikroflora beteiligt waren. — Der frischen Milch sowohl, wie den geimpften Milchproben gemeinsam sind vier Bakterienarten, nämlich Bacillus mesentericus, der nur noch bei 12° nachweisbar war, ferner Bacterium acidi lactici, Bacterium fluorescens und in ganz bescheidener Menge auch Bacterium coli. Durch das Impfmaterial wurde besonders Bacterium acidi lactici den Milchproben dieser Serie zugeführt;

dazu in untergeordneter Menge Bacterium aërogenes und Bact. Güntheri. Besonders groß war die Zahl der durch die Impfung in die Milch übertragenen Keime von Bacillus putrificus. Trotzdem aber 6,3 Millionen pro Kubikzentimeter in die Versuchsproben übertragen wurden, kam diese Art bei der Untersuchung nicht mehr zum Vorschein.

Serie X.

Einwirkung von Kleieprobe A, die angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war, auf Konsummilch.

Herstellung und Untersuchung der Milchproben wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M VI a	M VI b	M VI c
Aufbewahrungstemperat.	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchg.	24 Std.	48 Std.	5 Tage
Geschmack	unrein sauer	sauer, schwach ranzig	säuerlich-bitter
Säuregrad	9,7 n/10 NaOH	11,9 n/10 NaOH	10,6 n/10 NaOH
Makroskop. Aussehen	sehr stark gebläht	gallertig geronnen, bedeutend Gas	ziegerig geronnen, deutlich Gas

Gesamtkeimzahlen pro ccm Milch.

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Maximal-zahlen
M VI a	110 Mill.	140 Mill.	180 Mill.	185 Mill.
M VI b	650 „	1900 „	800 „	2100 „
M VI c	1720 „	1600 „	500 „	1800 „

Die Flora im einzelnen (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M VI a		M VI b		M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	50	3
Bacterium coli	—	—	20	1	—	—
Bacterium acidi lactici	50	27	230	11	350	18
Bacterium aërogenes	130	70	350	17	100	5
Bacterium Güntheri	5	3	1500	71	1300	74
Gesamtzahl	185	100	2100	100	1800	100

Wie aus einem Vergleich dieser Mikroflora mit jener der Probe I 3 in Serie II, p. 29 hervorgeht, finden sich beiderorts die nämlichen Bakterienarten. Einzig Bacillus putrificus und Bacterium putidum sind in vorstehender Serie verschwunden. In qualitativer Beziehung herrscht also zwischen dem Impfmaterial und den geimpften Milchproben eine gewisse Übereinstimmung. Die Differenzen sind vorwiegend quantitativer Art. Im Impfmaterial waren die fluoreszierenden Arten weit überwiegend (52 Proz.). Das Substrat war für diese Gruppe relativ günstiger als für die konkurrierenden Milchsäurebakterien. In der geimpften Milch finden wir nun aber ein gerade umgekehrtes Verhältnis. Während die gasbildenden Milchsäurebakterien im Impfmaterial insgesamt 28 Proz. der Flora beanspruchen, sind sie in Probe VI c mit 23 Proz., in VI b mit 29 Proz. und in Probe VI a sogar mit 97 Proz. der Gesamtkeimzahl vertreten. Wie in allen anderen vorhergehenden Serien finden wir also auch hier die ausgesprochene Tendenz einer mit der Temperatur steigenden Überhandnahme der Gasbildner. Genau den umgekehrten Weg schlagen, speziell in Serie X, die nichtgasbildenden Milchsäurebakterien ein. Die prozentuelle Beteiligung derselben an der Gesamtkeimzahl steigt von 3 auf 71 und 74. Wenn auch dem Bacterium Güntheri in der bei 12° C aufbewahrten Milch nicht optimale Wachstumsbedingungen dargeboten wurden, so vermochte doch auch hier diese ans Substrat besonders angepaßte Art leicht die Oberhand zu gewinnen, weil die genannte Temperatur nahezu das Minimum für die gasbildenden Arten, die beim Konkurrenzkampfe allenfalls in Betracht hätten kommen können, bedeutete.

Die Frage nun, ob bei vorstehender Serie die Impfung mit gärender Kleie wirklich einen wahrnehmbaren Einfluß auf Quantität und Qualität der Bakterienflora auszuüben vermochte, muß entschieden bejaht werden. Diese Einwirkung besteht einerseits in einer Begünstigung der Gasbildner, andererseits in der Zurückdrängung des Bacterium Güntheri. Diese Tatsache soll folgende Tabelle veranschaulichen:

Zahlen in Millionen pro ccm.

Probe	Aufbewahrungs-Temperatur	Coli-aërogenes-Gruppe				Bacterium Güntheri			
		in Kontrollmilch		in geimpfter Milch		in Kontrollmilch		in geimpfter Milch	
		absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
KMa u. MVIa	37° C : 24h	8	31	180	97	16	61	5	3
KMb u. MVIb	22° C : 48h	580	16	600	29	2900	80	1500	71
KMc u. MVIc	12° C : 5 Tg.	149	10	450	23	1410	89	1300	74

Bei 37° C finden wir in der Kontrollmilch nur 8 Millionen Keime von der Coli-aërogenes-Gruppe pro Kubikzentimeter, bei der geimpften Milch jedoch wuchs die Zahl der Vertreter der Coli-aërogenes-Gruppe in der gleichen Zeit (24 Stunden) auf 180 Millionen heran. Die geimpfte Milchprobe VI a stellt also tatsächlich fast eine Reinkultur von Gasbildnern dar. Umgekehrt verhält sich das Bacterium Güntheri. Diese Art erreichte in der Kontrollprobe bei 37° C = 61 Proz., in der geimpften Milch aber nur noch die geringe Zahl von 3 Proz. Etwas weniger scharf sich abhebend, aber trotzdem ganz deutlich hervortretend, sind die Zahlen bei den Versuchsproben von 22° und 12° C. Ohne Impfung: Wirksames Zurückdrängen der Gasbildner und Hervortreten des Bacterium Güntheri; mit Impfung: Deutliches Zurückgehen des Bacterium Güntheri und Begünstigung der Gasbildner.

Zusammenstellung der Hauptergebnisse aus Kleieprobe A.

1. Die Keimzahlen in Millionen pro Gramm lufttrockene Substanz berechnet bzw. pro Kukibzentimeter Milch:

Gärende Kleieprobe A als Impfmaterial			Aufbewahrungstemperaturen d. geimpften Milchproben	Milchproben	
Dauer der Gärung	Bei 37° C Serie I	Bei 22° C Serie II		Kontrollmilch Serie III	Milch + Kleie frisch Serie IV
24 Std.	12010	56 000	37° C	26	33
48 Std.	1 808,6	153 000	22° C	3640	1590
5 Tage	660	60 000	12° C	1569	2210

Fortsetzung.

Aufbewahrungstemperatur der geimpften Milchproben	Milch + Impfmaterial, das bei 37° C gärte			Milch + Impfmaterial, das bei 22° C gärte		
	Serie V	Serie VI	Serie VII	Serie VIII	Serie IX	Serie X
37° C	111	854	867	712	180	185
22° C	2430	1702	2820	2430	1960	2100
12° C	2980	1930	1310	1850	1160	1800

2. Die am häufigsten vorkommenden Arten in Prozenten:

a) Im Gärmaterial.

Art der Probe	Temperatur	Fluoreszierende: B. fluorescens u. B. putidum	Bact. coli	Bact. acidi lactici	Bact. aërogenes	Bact. Güntheri
Frische Milch	—	14	3	14	—	—
Frische Kleie	—	24	2	14	1	—
Kleie A nach 24 Std.	37° C	7	5	37	7	6
„ A „ 48 „	37° C	—	—	21	—	28
„ A „ 5 Tagen	37° C	—	—	5	—	62
Kleie A nach 24 Std.	22° C	5	4	57	12	—
„ A „ 48 „	22° C	5	—	40	1	3
„ A „ 5 Tagen	22° C	52	—	10	8	12

b) In den Milchproben.

Bakterienart	Aufbew. Temper. C	Kontrollproben	Milch + frische Kleie Serie IV	Milch + Kleie bei 37° C			Milch + Kleie bei 22° C		
				Serie V	Serie VI	Serie VII	Serie VIII	Serie IX	Serie X
Fluorescierende	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
„	22°	4	2	—	—	1	—	—	—
„	12°	1	4	7	4	3	4	1	3
Bacterium coli	37°	—	6	—	1	1	3	6	—
„ „	22°	1	3	2	—	3	—	—	1
„ „	12°	1	1	1	3	—	3	2	—
Bact. acidi lactici	37°	19	27	68	23	40	63	33	27
„ „ „	22°	14	6	23	15	11	1	7	11
„ „ „	12°	7	5	9	26	12	11	6	18
Bact. aërogenes	37°	12	—	7	70	47	28	50	70
„ „	22°	1	—	—	8	3	—	1	17
„ „	12°	2	—	2	—	—	6	3	5
Bact. Güntheri	37°	61	64	11	6	9	6	11	3
„ „	22°	80	88	74	74	79	99	92	71
„ „	12°	89	90	81	67	84	75	87	74

3. Schlußfolgerungen aus den mit Kleieprobe A ausgeführten Versuchen:

In bezug auf das Gärmaterial:

Bei 37° C setzt der Verlauf der Gärung in angefeuchteter Kleie energisch ein, hat aber schon nach dem ersten Tage seinen Höhepunkt erreicht. Nun findet eine beständige und ziemlich schnelle Keimzahlabnahme statt.

Bei 22° C steigt die Keimzahl in der Kleie ebenfalls äußerst rasch an. Sie erreicht aber das Maximum erst nach 48 Stunden. In diesen Gärstadien wurde überhaupt die höchste der gefundenen Keimzahlen aller gärenden Kleieproben festgestellt. Nach dem zweiten Tage setzt auch hier eine mäßig schnelle rückläufige Bewegung ein.

In allen Fällen tritt im Verlaufe der Gärung sowohl bei 37° C als auch bei 22° C ein bedeutender Wechsel in der Flora auch in qualitativer Richtung ein.

In bezug auf die mit frischer und gärender Kleie geimpften Milchproben:

Quantitativ: Bei 37° C zeigt sich die makroskopische Veränderung bei allen Milchproben am frühesten; bei 12° C immer am spätesten.

Sowohl die Kontrollmilch als die geimpften Milchproben zeigen bei 37° C den relativ kleinsten Bakteriengehalt. Bei der Kontrollmilch, wie bei allen jenen Milchproben, welche mit einem Material geimpft wurden, das entweder bei 22° C oder während 5 Tagen bei 37° C in Gärung verblieb, finden wir die größte Keimzahl immer in der bei 22° aufgestellten Probe der betreffenden Serie.

Durch die Impfung wird der Keimgehalt quantitativ in der bei 37° C aufgestellten Milch am intensivsten beeinflußt und zwar im Sinne einer sehr bedeutenden Erhöhung der Keimzahl. — In den bei 22° C und 12° C aufgestellten Milchproben ist ein Einfluß durch das Impfmaterial kaum festzustellen.

Frische Kleie vermag in den bei unseren Versuchen angewendeten Impfungen den Bakteriengehalt der Milch weder quantitativ noch qualitativ wesentlich zu beeinflussen.

Qualitativ: Die wichtigste Gruppe der Bakterien ist, sowohl in den Kontrollproben als in den geimpften Milchproben, immer die Gruppe der Milchsäurebakterien.

Die Gasbildner und die Nichtgasbildner dieser Gruppe treten in den einzelnen Milchproben in sehr verschiedenem Mengenverhältnis auf. Dieses Verhältnis wird zum Teil bestimmt durch die Art des Impfmaterials, weit mehr jedoch durch die Gärtemperatur, welcher die geimpfte Milchprobe ausgesetzt wird.

In bezug auf das Verhalten einzelner Arten ist folgendes zu bemerken:

Das Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N. kommt in frischer Milch, sowie in gärender Kleie, die bei 22° C aufbewahrt wird, ziemlich regelmäßig vor und vermehrt sich auch in bedeutendem Maße. In Milch, die einer Temperatur von 37° C ausgesetzt wird, läßt sich diese Art nur ausnahmsweise und immer nur innerhalb der ersten Stunden der Gärung in sehr spärlicher Zahl nachweisen. Dagegen ist Bacterium fluorescens ein ganz regelmäßiger Bewohner aller jener Milchproben, die längere Zeit bei 12° C verbleiben.

Bacterium coli (Escherich) L. et N. tritt in typischer Ausbildung immer nur in ganz bescheidener Zahl und meistens in Milchproben bei 37° oder bei 12° C auf.

Der weitaus häufigste Bewohner der Milch ist unter den Gasbildnern das Bacterium acidi lactici Hüppe, das vor allem bei 37° üppig gedeiht, aber auch bei 22° und 12° C regelmäßig nachgewiesen werden kann. Bei 37° C tritt zu Bacterium acidi lactici sehr häufig auch das Bacterium aërogenes Escherich, das nicht selten, namentlich in den geimpften Milchproben, alle anderen Arten überwuchert. — Bemerkenswert ist, daß das Schleimbildungsvermögen bei niederen Temperaturen und insbesondere nach mehrmaligem Überimpfen auf künstliche Nährböden sehr leicht verloren gehen kann. Bacterium aërogenes ist dann von Bacterium acidi lactici kaum mehr zu unterscheiden.

Das Bacterium Güntheri L. et N.[1]) bleibt im Konkurrenzkampf mit anderen Bakterien regelmäßig Sieger bei Temperaturen um 22° C. Sobald die Temperatur über 30° hinaufgeht, gewinnen in den geimpften Milchproben die Gasbildner sehr leicht die Oberhand. Bei niederer Temperatur zeigt Güntheri in der Regel ein herabgemindertes Säureproduktionsvermögen.

3. Eingehende Untersuchung der Kleieprobe B.

Diese Probe ist im Gegensatz zu Probe A eine feinkörnige Kleie. Sie wurde am 3. November 1908 von der nunmehr eingegangenen Mühle am oberen Mühlesteg, Zürich, abgeholt. Das Material sah frisch, normal aus und wurde bis zur Verarbeitung in sterilem Glasgefäß bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Am 20. November 1908 wurde das Material nach dem p. 23 angegebenen Schema verarbeitet. Der Untersuchung der frischen Kleie folgte die der sechs gärenden Proben, und dann wurde, wie bei Probe A, die Einwirkung des Futtermittels auf frische Konsummilch festgestellt.

Übersicht der Verarbeitung: Siehe auf p. 23.

I. Kleieprobe B frisch.

Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse.

Es wurden gezählt:

Auf gewöhnlichen Gelatineplatten . . .	12,3	Millionen	Keime	pro	Gramm
„ „ Agarplatten	1,2	„	„	„	„
In Traubenzuckeragar hoher Schicht .	0,8	„	„	„	„

Gesamtzahl **13,5** Millionen pro Gramm.

Die einzelnen Arten waren vertreten wie folgt:

Bakterienart	Zahlen in Millionen pro g	%
Bacterium fluorescens	3,0	22
Bacillus mesentericus	0,4	3
Bacterium herbicola aureum . .	5,5	41
Gelber Gasbildner	2,0	14
Bacterium acidi lactici	0,6	5
Bacterium Güntheri	0,6	5
Unbekannte Kokken	1,4	10
Gesamtzahl	**13,5**	**100**

Bemerkenswert ist vor allem der große Keimgehalt vorstehender Probe. Während Probe A nur 4 180 000 Bakterien pro Gramm barg, weist die feine Kleie mehr als die dreifache Zahl auf. — Genau ¼ aller Keime gehören verflüssigenden Arten an; jedoch ist das Peptonisierungsvermögen derselben ganz bedeutend reduziert. — In etwas geringerer Menge als diese Gruppe sind die Gasbildner vertreten. Oft bereitete es bedeutende Schwierigkeiten, den stark variierenden gelben Gasbildner und das nicht typisch ausgeprägte Bact.

---

[1]) = Bacterium lactis acidi Leichmann = Streptococcus acidi lactici Grotenfeldt = Streptococcus lactis (Lister) Löhnis.

herbicola aureum, das hier das Hauptkontingent der gesamten Flora stellt, mit Sicherheit auseinander zu halten; bei Herbicola war nämlich die Zoogloënbildung nicht immer deutlich wahrnehmbar. Die Impfung der Kolonien in hohe Schicht oder Schüttelkultur und auftretende bzw. mangelnde Gasbildung war dann für die Erkennung der Art ausschlaggebend. — Daß in der Kleie das Bacterium herbicola aureum zuweilen dominiert, scheint unschwer erklärlich. Diese Art ist ja ein regelmäßiger Epiphyt der grünen Pflanzen, der auch auf die Oberfläche der Getreidekörner übergeht. Eine große Zahl der so übertragenen Keime bleibt an der Kleie haften. — In gärendem Material aber vermag das Bacterium herbicola aureum bei 37° sich kaum 24 Stunden zu halten. Bei 22° findet noch eine bedeutende Vermehrung statt; die Art aber verschwindet, wie die folgenden Untersuchungen zeigen werden, immer mehr, je stärker die Gruppe der Milchsäurebakterien die Oberhand zu gewinnen vermag.

II. Untersuchung der gärenden Kleie B.

Die Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben geschah auf die p. 10 angegebene Weise.

Serie I.

Gärende Kleieproben Ia, Ib und Ic.

Voruntersuchung.

Kurze Bezeichnung der Proben	Kleie I a	Kleie I b	Kleie I c
Temperatur u. Dauer d. Gärung	37° C 24 Std.	37° C 48 Std.	37° C 5 Tage
Makr. Aussehen der Proben . .	Zieml. Schimmelansatz, Geruch nach erhitztem Heu	Starke Schimmelwucherung, Geruch aufdringlich muffig	Viel Schimmel, Material braun, Geruch brenzlich muffig

Gesamtkeimzahlen (in Millionen pro g).

Bezeichnung der Probe	Molkengelatineplatten	Milchzuckeragarplatten	Milchzuckeragar hohe Schicht	Total
Kleie I a. .	1940	1800	2800	3700
Kleie I b. .	4100	3900	4700	6750
Kleie I c. .	1900	2020	2500	3500

Die Flora im besonderen (Keimzahlen in Millionen pro g).

Bakterienart	Kleie I a		Kleie I b		Kleie I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	200	3	400	11
Bacterium coli	90	3	1900	28	300	9
Bacterium acidi lactici	1800	48	1800	27	600	17
Bacterium aërogenes	380	10	620	9	—	—
Bacterium Güntheri	10	—	2100	31	2200	63
Bacterium herbicola aureum . .	400	11	—	—	—	—
Gelber Gasbildner.	800	22	—	—	—	—
Kokken	220	6	130	2	—	—
Gesamtzahl	3700	100	6750	100	3500	100

Gegenüber der frischen Kleie ist zunächst eine äußerst rapide Vermehrung der Spaltpilze wahrzunehmen. Innerhalb 24 Stunden ist die Zahl von 13,5 auf 3700 Millionen, also reichlich um das 270-fache angestiegen. Nach 48 Stunden hat sich das Verhältnis auf rund 500 erweitert. Dann beginnt eine ziemlich schnelle Abnahme des Keimgehaltes, so daß nach 5 Tagen die Zahl der lebenskräftigen Individuen schon unter die nach 24 Stunden vorhandene Zahl herabgesunken ist. Auch hier zeigt uns ein Vergleich der Keimzahlen auf den einzelnen Nährböden mit den bezüglichen Zahlen des Gesamtbakteriengehaltes auf den ersten Blick, wie zweckmäßig es für jede quantitative Untersuchung ist, eine Kombination der drei angewendeten Nährböden zu benutzen.

Nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ ist zwischen frischem und gärendem Material ein deutlicher Unterschied festzustellen. Die prozentuelle Vertretung der einzelnen Arten hat im Laufe der Gärung sehr stark gewechselt. Nach 24 Stunden haben wir im Gärmaterial folgende Arten nicht mehr nachweisen können: Bacillus mesentericus, der ohne Zweifel im Gärmaterial noch vorhanden war. Aber da bekanntlich die Spore, wenn sie in ein neues Nährmedium gelangt, bzw. in andere Existenzbedingungen versetzt wird, nicht selten eine Art Ruhestadium durchläuft, bevor sie zur Keimung schreitet, so ist es erklärlich, daß Bacillus mesentericus sich innerhalb der kurzen Zeit nicht zu einer so großen Zahl zu entwickeln vermochte, um in der sehr stark verdünnten Aufschwemmung noch in genügend großer Zahl vertreten zu sein. Im frischen Krüsch war er pro Gramm nur mit 400 000 Keimen nachweisbar; daher wäre wenigstens eine 100-fache Vermehrung nötig gewesen, um in der Probe I a nur mit 1 Proz. beteiligt zu sein. Erst nach 2 Tagen vermochte der Kartoffelbacillus dann wieder hervorzutreten. In Probe Ib erreicht er 3 Proz., in Ic sogar 11 Proz. der gesamten Keimzahl. — Ganz verschwunden ist das Bact. fluorescens. Diesem Mikroorganismus war die Temperatur von 37° entschieden zu hoch. Wenn er auch noch ausnahmsweise zum Wachstum gelangte, so zeigte er in der Regel Involutionsformen. Alle anderen im frischen Material nachgewiesenen Arten sind nach 24 Stunden bei 37° C in größerer oder kleinerer Zahl noch vorhanden. Weitaus vorherrschend sind, entsprechend der für sie optimalen Temperatur, die Gasbildner. Sie erreichen in Probe I a 83 Proz. der Gesamtflora. Obenan steht das Bact. acidi lactici. Im frischen Krüsch nur mit 0,6 Millionen pro Gramm vertreten, weist es im 24 Stunden alten Material nicht weniger als 1800 Mill. Keime auf, hat sich also rund ums 3000-fache vermehrt. Dem Bacterium acidi lactici kommt quantitativ am nächsten der gelbe Gasbildner. Da dieser jedoch schon im frischen Material mit 2 Millionen Keimen pro Gramm vertreten war, so ist dessen Vermehrung nur rund eine 400-fache. Neu aufgetreten sind die beiden Verwandten von Bacterium acidi lactici: Bacterium coli und Bacterium aërogenes. Doch sind beide nicht in ganz typischer Ausbildung vorhanden. Eine relativ bedeutende Vermehrung hat Bacterium herbicola aureum erfahren. Trotzdem diese Art von 41 auf 11 Proz. zurückging, hat sie sich doch absolut um rund das 73-fache vermehrt. Das morphologische Bild zeigt jedoch, daß schon nach 24 Stunden die Großzahl der Stäbchen deutliche Involutionsformen angenommen hatte. Nach 2 Tagen war denn auch Herbicola in der gärenden Probe nicht mehr nachweisbar. — In hoher Schicht endlich ließ sich auch noch eine bedeutende Zahl von Kokken nachweisen. Doch scheinen auch diese ziemlich säureempfindlich zu sein und werden um so mehr zurückgedrängt, je mehr eine intensivere Milchsäuregärung überhand nimmt.

Große Fortschritte hat nach 48-stündiger Gärung das Bacterium coli gemacht. Im frischen Krüsch ursprünglich gar nicht nachweisbar, ist es nun auf 1900 Millionen angewachsen und nimmt damit 28 Proz. der gesamten Keimzahl in Anspruch. Dagegen vermag sich diese Art auf die Dauer nicht zu halten und nach 5 Tagen ist sie absolut um mehr als $^4/_5$, relativ von 28 auf 9 Proz. zurückgegangen. Bacterium acidi lactici ist nach 48-stündiger Gärung in gleicher Anzahl nachweisbar wie in der 24 Stunden lang gegorenen Kleie. Relativ dagegen zeigt diese Art einen Rückgang von 48 auf 27 Proz. Eine Art Mittelstellung zwischen den beiden letztgenannten Spaltpilzarten nimmt Bacterium aërogenes ein, indem diese Art eine absolute Zunahme von 380 auf 620 Millionen pro Gramm Kleie aufweist, relativ dagegen von 10 auf 9 Proz. zurückgegangen ist. Während nun aber Bacterium aërogenes im weiteren Verlaufe der Gärung in Probe I c nicht mehr nachzuweisen ist, beanspruchen Bacterium coli und Bacterium acidi lactici in der genannten Probe immer noch 9 bzw. 17 Proz. der gesamten Mikroflora. — Eine sehr rasche und dauernde Entwicklung zeigt Bacterium Güntheri. In der frischen Kleie in ganz bescheidener Menge vorhanden, setzt dessen Vermehrung bei 37° langsam ein; nach 48 Stunden ist dieser intensive Säurebildner schon mit 31 Proz. vertreten, um nach 5 Tagen beinahe ⅔ des gesamten Keimgehaltes zu beanspruchen. Gerade umgekehrt erging es den Kokken. Nach 24-stündiger Gärung in noch ganz ansehnlicher Zahl vorhanden, zeigen sie nach 48 Stunden einen starken Rückgang und sind nach 5 Tagen nicht mehr nachzuweisen.

Serie II.

Gärende Kleieproben I 1, I 2 und I 3.

Herstellung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Untersuchungsergebnisse.

Kurze Bezeichnung	Kleie I 1	Kleie I 2	Kleie I 3
Gärdauer u. Gärtemperatur	24 Std. bei 22° C	48 Std. bei 22° C	5 Tage bei 22° C
Makroskop. Aussehen . . .	Wenig verändert, schwach säuerlicher Geruch	Etwas gelblich verfärbt, Geruch säuerlich-muffig	Dunkelbräunlich, leichter Schimmelanflug, scharf saurer Geruch

Gesamtkeimzahlen (Zahlen in Millionen pro g).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
Kleie I 1	17 300	16 200	2 000[1])	18 520
Kleie I 2	105 000	88 000	13 800[1])	117 600
Kleie I 3	31 800	30 000	5 000	38 500

In bezug auf die Gesamtkeimzahlen verhalten sich die Proben dieser Serie ganz ähnlich wie jene der Serie I. Es fand bis zum 2. Tage eine sehr rasche Zunahme; vom 2.—5. Tage aber wieder eine ganz bedeutende Abnahme des Keimgehaltes statt.

---

[1]) Die hohe Schichtkultur enthielt auch in bescheidener Menge Bacillus putrificus coli.

Die einzelnen Arten (Zahlen in Millionen pro g).

Bakterienart	Kleie I 1		Kleie I 2		Kleie I 3[1])	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	750	4	6 000	5	1 500	4
Bacterium putidum	—	—	6 000	5	4 000	10
Bacterium coli	1 000	5	5 000	4	4 000	10
Bacterium acidi lactici	1 850	10	13 000	11	7 000	18
Bacterium aërogenes	550	3	600	—	13 000	34
Bacterium Güntheri	370	2	7 000	6	9 000	24
Bacterium herbicola aureum . .	6 000	33	10 000	9	—	—
Gelber Gasbildner.	8 000	43	70 000	60	—	—
Gesamtzahlen	18 520	100	117 600	100	38 500	100

Was die einzelnen Arten betrifft, so ist hervorzuheben, daß Bacillus mesentericus ganz verschwunden ist. Dafür aber tritt die Gruppe der Fluoreszierenden besonders gegen Ende der Gärzeit stärker in den Vordergrund. Die Kokken vermochten sich nicht genügend rasch zu vermehren, um in der stark verdünnten Aufschwemmung noch zur Geltung zu kommen. Dagegen nehmen, wie gewöhnlich, die Gasbildner wieder die erste Stelle ein. Hier ist aber, im Gegensatz zu den Proben der Serie I, der gelbe Gasbildner Holliger in den beiden ersten Gärstadien weit vorherrschend, nimmt er doch in I 1 = 43, in I 2 sogar 60 Proz. der Gesamtkeimzahl in Anspruch. Demgegenüber treten die gasbildenden Milchsäurebakterien der Coli-aërogenes-Gruppe im ersten Stadium der Gärung bedeutend zurück (18 und 15 Proz.). Je mehr aber der gelbe Gasbildner im weiteren Verlauf der Gärung zurückgeht, um so mächtiger drängen sich nun die Vertreter der Coli-aërogenes-Gruppe in den Vordergrund, und in der 5 Tage alten Probe beanspruchen sie nicht weniger als 62 Proz. des gesamten Bakteriengehaltes. Dabei ist besonders hervorzuheben, daß das ursprünglich im frischen Material gar nicht nachweisbare Bacterium aërogenes reichlich ⅓ der Gesamtflora ausmacht. Auch das Bacterium Güntheri ist aus bescheidenen Anfängen zu einer recht ansehnlichen Vertretung gelangt. Im frischen Krüsch wurde es mit 600 000 Keimen nachgewiesen; nach 24-stündiger Gärung finden wir schon die stattliche Zahl von 370 Millionen, nach 48 Stunden 7000 und nach 5 Tagen 9000 Millionen pro Gramm. Währenddem also mit Ausnahme der Coli-aërogenes-Gruppe alle Arten teils bedeutend zurückgegangen, teils ganz verschwunden sind, hat das Bact. Güntheri bis zum Schlusse eine stete Zunahme aufzuweisen.

Wir sehen also auch in dieser Serie wieder, wie der ganze Gärungsverlauf von einem fortwährenden Wechsel einzelner Arten begleitet ist und einen ununterbrochenen metabiotischen Prozeß darstellt.

III. Untersuchung der frischen Milch und der Kontrollproben.

Die frische Konsummilch b.

Am 16. Dezember 1908 wurde die frisch gemolkene Milch vom „Strickhof“ abgeholt und sofort nach Ankunft im Laboratorium untersucht. Diese Milch diente für alle Impfungen der nachfolgenden Serien IV—X und wurde auch selbstredend als Kontrollmilch verwendet.

---

[1]) Die hohe Schichtkultur enthielt auch in bescheidener Menge Bacillus putrificus coli.

Die frische Milch selbst enthielt im Kubikzentimeter folgende Mikroflora:

Bakterienart	Zahlen absolut	%
Verflüssigende Kokken	18 000	14
Bacillus mesentericus	1 000	1
Bacterium acidi lactici	40 000	31
Bacterium aërogenes	6 000	5
Schlankes Stäbchen in sehr kleinen Kolonien	2 000	2
Coli-ähnliche Kurzstäbchen	60 000	47
Gesamtzahl	127 000	100

Der absolute Keimgehalt der frischen Milch ist verhältnismäßig nur klein. Doch kommt ein relativ sehr hoher Gehalt an gasbildenden Bakterien vor. Von der Coli-ähnlichen Gruppe allein sind volle 47 Proz. des Gesamtkeimgehaltes vertreten. Dazu kommen noch 31 Proz. des Bact. acidi lactici und 5 Proz. Bact. aërogenes, so daß einzig die Gasbildner $^4/_5$ der gesamten Flora ausmachen. Bacillus mesentericus, der dermutlich aus der Stalluft, der Einstreu oder aus dem Heu herstammen dürfte, ist hier verhältnismäßig spärlich vertreten. Ebenso findet man in frischer Milch in der Regel einen viel höheren Gehalt an Kokken.

Serie III.

Die Kontrollmilchproben.

Als Kontrollmilch wurde die obige frische Milch b in Erlenmeyerkölbchen den bekannten drei Temperaturen 37°, 22° und 12° C ausgesetzt. Die Proben wurden benannt mit KM a, KM b und KM c.

In der Untersuchungsmethode wurde bei allen folgenden Milchproben insofern vom bisherigen Verfahren etwas abgewichen, als ein bestimmter Termin von der Impfung bis zur Untersuchung — bei den Kontrollmilchen vom Aufstellen bei bestimmter Temperatur bis zur Untersuchung — nicht mehr eingehalten wurde; sondern jede Milchprobe gelangte sofort zur Verarbeitung, sobald sie deutliche makroskopische Veränderung zeigte.

Vorprüfung der Kontrollproben:

Kontrollprobe KM a bei 37° aufgestellt: Nach 20 Stunden kompakt geronnen; am Boden zahlreiche Gasblasen, reichlich gelblich-weißes Serum. Säuregrad 9,9 n/10 NaOH, Geschmack ziemlich rein sauer. Unter dem Mikroskop wurden vorherrschend Bacterium acidi lactici-ähnliche Kurzstäbchen beobachtet.

Kontrollprobe KM b bei 22° C: Nach 48 Stunden schön gallertig geronnen, kein Gas bemerkbar, ganz schmale Serumzone, Geschmack rein sauer. Säuregrad 10,0 n/10 NaOH. Mikroskopisches Bild: Güntheriformen und Kurzstäbchen.

Kontrollprobe KM c bei 12° C: Erst nach 4½ Tagen deutlich makroskopisch verändert, nur Spuren von Gasbildung, ca. 2 mm breite, gelbliche Serumzone, Säuregrad 12,2 n/10 NaOH. Gerinnung ganz feinflockig, Geruch etwas ranzig, Geschmack ziemlich sauer mit Stich ins Bittere. Mikroskopisches Bild: Vorwiegend Güntheriformen.

Gesamtkeimzahlen (in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Total
KM a bei 37° C	330	560	500	630
KM b bei 22° C	1920	2000	2400	2550
KM c bei 12° C	1000	1300	1400	1470

Qualitative Untersuchung (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	Kontrollmilch a		Kontrollmilch b		Kontrollmilch c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	80	13	10	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	80	3	300	20
Bacterium coli	170	27	460	18	90	6
Bacterium acidi lactici . . .	300	47	570	22	80	5
Bacterium aërogenes	—	—	130	5	—	—
Bacterium Güntheri	50	8	1300	52	1000	69
Gelbes, unbewegliches Kurzstäbchen	30	5	—	—	—	—
Gesamtzahl	630	100	2550	100	1470	100

Die Flora der Kontrollproben ist im großen und ganzen, wie dies auch nicht anders zu erwarten war, ein Abbild von der in der frischen Milch vorhandenen Flora. Während jedoch in früheren Milchproben das Bacterium Güntheri bedeutend stärker in den Vordergrund trat, erscheint es hier mehr zurückgedrängt. In Probe KMa nimmt es nur 8 Proz., in Probe KMb 52 und in Probe KMc 69 Proz. der Gesamtkeimzahl ein. In den früheren Kontrollproben vermochte Güntheri viel entschiedener das Übergewicht zu bekommen und war in einer Menge von 61 bzw. 80, selbst bis zu 89 Proz. vertreten. Der Grund eines relativ starken Zurücktretens des genannten Organismus dürfte darin liegen, daß in der frischen Milch diesmal die Gasbildner außergewöhnlich stark vertreten waren, wenn auch die Milch selbst keineswegs als außerordentlich bakterienreich bezeichnet werden darf.

Verschwunden sind in den Kontrollproben die Kokken, die überhaupt immer am frühesten zugrunde zu gehen scheinen. Dann ist auch das schlanke unbekannte Stäbchen, das nur sehr kleine Kolonien bildete, nicht mehr nachweisbar. Dagegen trat in der Probe bei 22° C und namentlich in jener bei 12° C das Bacterium fluorescens recht kräftig hervor. Als neuer Organismus erschien ferner in der bei 37° C aufgestellten Milch ein unbewegliches Kurzstäbchen in gelblichen Kolonien, das identisch zu sein schien mit dem in pasteurisierter Milch regelmäßig anzutreffenden Organismus. Die Coli-aërogenes-Gruppe ist, wie begreiflich, am besten in der Kontrollprobe bei 37° C vertreten, nämlich mit insgesamt 74 Proz. In der Probe bei 22° C sinkt diese Zahl auf 45, um in der Milch bei 12° C auf 11 Proz. zurückzugehen.

IV. Einwirkung von frischer und gärender Kleie auf Konsummilch.

Serie IV.

Einwirkung von frischer Kleie B auf gewöhnliche Konsummilch b.

Zugleich mit Anlegung der Kulturen aus der frischen Konsummilch b wurden auch je 3 Proben dieser Milch b, je zu 100 ccm, mit $^1/_{100}$ g frischer Kleie B und befeuchtetem Material in verschiedenen Gärstadien geimpft. Die mit frischem Krüsch B beschickten Milchproben wurden benannt:

M I = Konsummilch b geimpft mit frischer Kleie B; Probe zu 37° C gestellt.
M II = „ b „ „ „ „ B; „ „ 22° C „
M III = „ b „ „ „ „ B; „ „ 12° C „

Makroskopische Vorprüfung:

M I: Nach 20 Stunden bedeutende Blähung, gelblich-weißliche, reichliche Serumausscheidung; Geschmack der Milch noch ziemlich normal, Säuregrad 10,9 n/10 NaOH. M II: Erst nach 40 Stunden deutliche makroskopische Veränderung; Milch schön gallertig geronnen, Gasbildung nicht deutlich, Geschmack ziemlich normal sauer; Säuregrad 11,1 n/10 NaOH. M III: Makroskopisch wahrnehmbare Veränderung tritt erst nach 4 Tagen ein, Gerinnung ganz feinflockig, Veränderung nur durch die 2 mm breite schwachgelbliche Serumzone festzustellen, Gasbildung fehlt; Säuregrad 11,1 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahlen (in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Total
M I	450	590	400	690
M II	1800	2300	1900	2400
M III	1000	1400	500	1500

Qualitative Untersuchung (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I		M II		M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	300	13	100	7
Bacterium putidum	—	—	—	—	80	5
Bacterium coli	140	20	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici	360	52	100	4	—	—
Bacterium aërogenes	80	12	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	80	12	2000	83	1320	88
Kokken	30	4	—	—	—	—
Gesamtzahl	690	100	2400	100	1500	100

Die geimpften Proben M I und M III zeigen im Verhältnis zu den parallelen Kontrollproben eine ganz unbedeutende Vermehrung der Keimzahlen, während umgekehrt die Kontrollprobe M b pro Kubikzentimeter 150 Millionen mehr Bakterien enthält, als die geimpfte sonst unter ganz gleichen Bedingungen aufbewahrte Probe. Quantitativ läßt sich also eine wesentliche, durchgreifende Einwirkung der Impfung auf die Flora der Milch nicht feststellen. Aus diesen Verhältnissen spricht also auch deutlich der Beweis, wie unzutreffend es wäre, allgemein anzunehmen, daß die geimpften Proben beim Eintritt der makroskopischen Veränderung immer keimreicher sein müßten, als die nichtgeimpften Kontrollproben.

Was die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora der Proben vorstehender Serie betrifft, so zeigt uns ein Vergleich mit den analogen Kontrollproben, daß bei 37° C die geimpfte Milch MI um relativ 10 Proz. reicher an Gasbildnern ist, als die bezügliche Kontrollprobe. Auch das Bacterium Güntheri, das in der frischen Milch nicht nachweisbar war, durch das Impfmaterial aber in ganz bescheidener Zahl der Milch MI zugeführt wurde, konnte in der letzteren nun in einem unbedeutend höheren Prozentsatz nachgewiesen werden, als in der Kontrollmilch. Dagegen ist Bacillus mesentericus, der sowohl in der frischen Milch als auch im Impfmaterial schwach vertreten war, in Probe MI nicht in einer zum Nachweis genügenden Zahl vorhanden.

Die größte Abweichung zwischen der Kontrollmilch und der mit frischem Material geimpften Probe zeigt sich bei 22° C. In der Kontrollmilch sind 6, in der geimpften Milch aber nur 3 Arten nachweisbar vertreten. Merkwürdigerweise erscheinen nun, im Gegensatz zu den bisherigen Erfahrungen, die Gasbildner in der Kontrollmilch viel zahlreicher vertreten. Hier machen sie 45 Proz. der Gesamtflora aus, dort nur 4 Proz. Umgekehrt verhält sich Bacterium Güntheri, das in der geimpften Milch mit 83 Proz., in der analogen Kontrollmilch aber nur mit 52 Proz. der Keimzahl beteiligt ist. Diese den früheren Ergebnissen scheinbar ganz widersprechenden Befunde lassen sich erklären, einerseits dadurch, daß die Konsummilch b selbst von Anfang an einen relativ außerordentlich hohen Gehalt an den genannten Gasbildnern barg, andererseits, daß durch die Impfung eine gewisse Menge des Bacterium Güntheri, das in der frischen Milch nicht in nachweisbarer Menge vorkam, zugeführt wurde.

Eine im allgemeinen bedeutend einheitlichere Flora in der geimpften Milch und in der betreffenden Kontrollprobe zeigt sich in der bei 12° C aufgestellten Milch. Aber auch hier vermochte sich die der frischen Milch angestammte Gasbildnergruppe auf Kosten des Bacterium Güntheri in der Kontrollprobe, wenn auch nur in sehr bescheidenem Maße, zu behaupten, während in der geimpften Probe das Bacterium Güntheri ein entsprechend größeres Übergewicht erlangte. In beiden Proben konnten sich auch die Fluoreszenten, dank des relativ geringen Säuregrades der Milch, einige Geltung verschaffen.

Im allgemeinen spricht auch aus den Ergebnissen dieser Serie wieder die Tatsache, daß die Ursprungsflora der frischen Milch, und vor allem die Aufbewahrungstemperatur, einen viel entscheidenderen Einfluß auf die Entwicklungsrichtung der Bakterienflora der Milch zu gewinnen vermögen, als eine Einimpfung von frischer Kleie in der in unseren Versuchen zur Anwendung gekommenen Menge ($^1/_{100}$ g auf 100 ccm Milch).

Serie V.

Einwirkung von Kleie B, die angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war, auf Konsummilch b.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung wie üblich. Benennung der geimpften Milchproben: MIa-Probe bei 37° C aufbewahrt, MIb-Probe bei 22° C aufbewahrt, MIc-Probe bei 12° C aufbewahrt.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Makroskopische Vorprüfung:

M Ia: Nach 16 Stunden starke Blähung, käsig-ziegerige Gerinnung; Geschmack noch ziemlich normal; Säuregrad 13,4 n/10 NaOH. M Ib: Nach 48 Stunden locker gallertig geronnen, deutliche Zeichen der Gasbildung; Geschmack normal sauer; Säuregrad 14,1 n/10 NaOH. M Ic: Erst nach 5 Tagen eine deutliche makroskopische Veränderung wahrnehmbar; Spuren von Gasbildung, ganz feinflockige Gerinnung, Geschmack säuerlich mit Stich ins Bittere; Säuregrad 10,8 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahlen (Zahlen in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M I a	80	240	90	298
M I b	1900	2200	2000	2400
M I c	1460	2300	1400	2980

Qualitative Zusammensetzung (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	400	13
Bacterium coli	20	7	100	4	—	—
Bacterium acidi lactici	60	20	200	8	200	7
Bacterium aërogenes	180	60	400	17	400	13
Gelber Gasbildner.	20	7	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	18	6	1700	71	1980	67
Gesamtzahl	298	100	2400	100	2980	100

Quantitativ läßt sich bei dieser Serie ebensowenig wie bei Serie IV eine starke Beeinflussung durch das Impfmaterial feststellen.

Während die geimpften Milchproben M Ia und M Ib mehr oder weniger bedeutend hinter dem Bakteriengehalte der nichtgeimpften Kontrollmilch zurückbleiben, weist M Ic ungefähr die doppelte Keimzahl wie die analoge Kontrolle auf. Auch in bezug auf die Zusammensetzung der Flora ist kein entschieden durchgreifender Unterschied zu konstatieren. Die Hauptvertreter sind hier wie dort die verschiedenen Arten von Milchsäurebakterien.

Bemerkenswert ist, daß Bacterium coli seine maximale Vertretung bei 37° C hat und in der Regel bei niederer Temperatur entweder zu Übergängen zu Bacterium acidi lactici hinneigt oder aber ganz verschwindet. Bacterium acidi lactici findet sich ganz regelmäßig in allen Proben; Bact. aërogenes scheint mit sinkender Temperatur prozentuell recht bedeutend zurückzugehen. Das Bacterium Güntheri muß bei 37° C, wie gewöhnlich, den Gasbildnern weichen und bekommt erst bei 22° und 12° C das Übergewicht.

Serie VI.

Einwirkung von Kleie B, die angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war, auf Konsummilch b.

Herstellung und Verarbeitung der Proben nach bekannter Methode. Bezeichnung: M IIa (37°), M IIb (22°) und M IIc (12°).

Makroskopische Vorprüfung:

M II a: Nach 16 Stunden typisch käsig-ziegerige Gerinnung; das Caseïn an Boden und Wänden haftend, reichlich ausgeschiedenes wässerig-grünliches Serum, Geschmack bedeutend sauer; Säuregrad 11,9 n/10 NaOH. M II b: Nach 48 Stunden ziemlich gleichmäßig gallertig geronnen, mäßig Gas, Geschmack ziemlich normal; Säuregrad 12,2 n/10 NaOH. M II c: Nach 4½ Tagen eine ca. 2 mm breite schwachgelbliche Serumzone, Milch ganz feinflockig geronnen, beim Schütteln wieder dünnflüssig, Geschmack unangenehm ranzig-bitter; Säuregrad 11,5 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahlen (in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M II a	350	600	900	930
M II b	1500	1800	300	1960
M II c	1750	1900	800	2060

Qualitative Untersuchung (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M II a		M II b		M II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	80	4
Bacterium putidum	—	—	—	—	30	1
Bacterium coli	70	8	10	1	—	—
Bacterium acidi lactici	300	32	400	20	200	10
Bacterium aërogenes	500	54	50	2	50	3
Bacterium Güntheri	50	5	1500	77	1700	82
Kokken	10	1	—	—	—	—
Gesamtzahl	930	100	1960	100	2060	100

Im Vergleich zur Kontrollmilch zeigt Probe II a eine bedeutend höhere Keimzahl; denn hier ließen sich 930 Millionen Keime pro Kubikzentimeter nachweisen, während in der entsprechenden Parallelprobe nur 630 Millionen festgestellt werden konnten. Ohne Zweifel hat also, wenigstens in dieser Probe, die Impfung zur Bakterienvermehrung beigetragen. Eine ähnliche Erscheinung haben wir in der bei 12° C belassenen Milch. Hier steht einer Keimzahl von 1470 Millionen in der Kontrollprobe eine solche von 2060 Millionen in der mit gärender Kleie geimpften Milch gegenüber. Es ist also eine Vermehrung von rund 40 Proz. des Bakteriengehaltes zu konstatieren. Abweichend von diesen Ergebnissen verhält sich hier, wie dies auch schon bei Serie V der Fall war, die bei 22° C aufgestellte Milch. Einem Keimgehalte von 2550 Millionen in der nicht geimpften Probe steht ein solcher von nur 1960 Millionen in der geimpften Milch gegenüber. Die Kontrollmilch ist also um ungefähr 30 Proz. bakterienreicher. Die Ursache ist einerseits der viel üppigeren Entwicklung der Gasbildner, andererseits der geringeren Keimzahl von Bact. Güntheri in der Kontrollmilch zuzuschreiben. In der geimpften Milch konnten von den ersteren 700 Millionen pro Gramm weniger nachgewiesen werden. Diesem Minus gegenüber besteht nur ein Plus von 200 Millionen, um welche Zahl die geimpfte Probe an Bacterium Güntheri reicher ist. In der Kontrollprobe waren die Gasbildner, wie bereits schon früher erwähnt, von Anfang an in relativ starkem Prozentsatz vertreten und vermochten sich daher zu sehr bedeutender Zahl zu entwickeln, bis Bact. Güntheri die Oberhand gewann und durch seine intensivere Säureproduktion der weiteren Wucherung etwelchen Einhalt gebot. In die geimpfte Probe aber wurde Bact. Güntheri durch das Impfmaterial schon von Anfang an in bedeutender Menge übertragen (21 Millionen pro 100 ccm); daher die größere Zahl an diesen Organismen in der geimpften Milch.

In bezug auf die einzelnen Arten muß auch hier wieder hervorgehoben werden, daß ein wesentlicher Unterschied nicht festgestellt werden kann. Einzig Bacillus mesentericus und das gelbe Kurzstäbchen sind in den Proben der vorstehenden Serie verschwunden, resp. nicht derart zur Vermehrung gelangt, daß sie bei diesem hohen Keimgehalt der Milch noch hervorzutreten vermochten. Auch Bact. fluorescens weist einen entschiedenen Rückschritt auf; dagegen ist dessen Parallelart Bacterium putidum neu aufgetreten. Bei 37° C kam auch noch eine Kokkenart in bescheidenem Maß zum Nachweis. Alle anderen Arten sind jenen der Kontrollmilchproben identisch und gehören der Gruppe der Milchsäurebakterien an. Das Schwergewicht der Abweichung in der geimpften und nicht geimpften Probe beruht also, wie schon angedeutet, darin, daß bei 22° C in der Kontrollmilch im allgemeinen die Gasbildner mehr dominieren, in der geimpften Probe aber relativ mehr das Bacterium Güntheri zur Vorherrschaft gelangte.

Serie VII.

Einwirkung von Kleie B, die angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war, auf Konsummilch b.

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie üblich. Bezeichnung: M III a (37° C), M III b (22° C) und M III c (12° C).

Makroskopische Vorprüfung:

M III a: Nach 16 Stunden typisch käsig-ziegerige Gerinnung, starke Blähung, eine große Menge weißlich-grünes Serum, Geschmack etwas fade sauer; Säuregrad 9,9 n/10 NaOH. M III b: Nach 40 Stunden schön gallertig geronnen, schwache Gasbildung, Geschmack normal sauer; Säuregrad 12,0 n/10 NaOH. M III c: Nach 5 Tagen schmale Serumzone, Gerinnung ganz feinflockig, keine Gasbildung sichtbar, Geschmack säuerlich-bitter; Säuregrad 11,6 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahl (Zahlen in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M III a	450	500	400	860
M III b	2200	2000	1800	2200
M III c	2500	1650	1200	2680

Die Gesamtkeimzahl bewegt sich hier wieder in den gewöhnlichen Grenzen. Die Proben bei 37° C und 12° C sind bakterienreicher, jene bei 22° C ist keimärmer als die zugehörigen Kontrollproben. Quantitativ ist also auch hier ein Einfluß der Impfung nicht zu bemerken.

Hinsichtlich qualitativer Zusammenstellung der Mikroflora siehe die Zusammenstellung auf der folgenden Seite.

Abgesehen vom Bacterium fluorescens in Probe III c haben wir in Serie VII eine absolute Reinkultur von Milchsäurebildnern. Bei der

Qualitative Zusammensetzung (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M III a		M III b		M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	400	15
Bacterium coli	50	6	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici	700	81	200	9	100	4
Bacterium aërogenes	100	12	100	5	80	3
Bacterium Güntheri	10	1	1900	86	2100	78
Gesamtkeimzahl	860	100	2200	100	2680	100

Milchprobe, die bei 37° C war, sind volle 99 Proz. Gasbildner; eine so hohe Zahl wurde von dieser Gruppe noch nie erreicht. Übrigens wies schon die käsig-ziegerige Gerinnung der Milch darauf hin, daß das Bacterium Güntheri stark zurückgetreten sei. Sobald aber die Temperatur auf 22° C sank, erlangte Bacterium Güntheri das Übergewicht. Die Gasbildner gingen auf 14 Proz. zurück. Ähnliche Verhältnisse treffen wir bei 12° C.

Als Kuriosum kann hier hervorgehoben werden, daß das Bact. Güntheri auf Gelatineplatten fast vollständig fehlt, während es auf Agarplatten und in hoher Schicht in großer Zahl auftritt. Die Ursache dieser Erscheinung dürfte wohl darin zu suchen sein, daß sich der Organismus während der 5-tägigen, bei 37° C stattgefundenen Gärung an die höhere Temperatur anpaßte und daher bei bedeutend geringerem Wärmegrade überhaupt nicht mehr aufkommen konnte. Endlich verdient noch angeführt zu werden, daß sowohl das Bacterium coli als auch Bacterium aërogenes mit sinkender oder steigender Temperatur immer mehr und mehr zum Bacterium acidi lactici konvergierten und selten mehr in typischer Ausbildung anzutreffen waren.

Serie VIII.

Einwirkung von Kleie B, die 24 Stunden bei 22° aufbewahrt wurde, auf Konsummilch b.

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie früher. Benennung: M IV a (37° C), M IV b (22° C) und M IV c (bei 12° C).

M IV a: Nach 16 Stunden griesige bis gallertige Gerinnung, reichliche Serumausscheidung, bedeutende Blähung, Geschmack unrein sauer; Säuregrad 9,1 n/10 NaOH. M IV b: Nach 36 Stunden schön gallertig geronnen, schwache Gasbildung, Geschmack rein, kräftig sauer; Säuregrad 13,9 n/10 NaOH. M IV c: Erst nach 5 Tagen Spuren einer makroskopischen Veränderung: Gerinnung ganz feinflockig, Milch beim Umschütteln wieder leichtflüssig; deutliche Gasbildung, Geschmack sauer und bitterlich; Säuregrad 10,5 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahlen (in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M IV a	290	330	400	670
M IV b	2100	2400	9000	9100
M IV c	1400	900	300	1400

Qualitative Ergebnisse (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IV a		M IV b		M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	70	5
Bacterium coli	30	5	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici	240	36	100	1	300	21
Bacterium aërogenes	300	44	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	—	—	9000	99	1030	74
Kokken	100	15	—	—	—	—
Gesamtzahl	670	100	9100	100	1400	100

Die in Milch IV a und IV c enthaltenen Quantitäten von Bakterien entsprechen fast genau den Zahlen der Kontrollproben. Einen ganz erstaunlich hohen Keimgehalt findet man diesmal in der bei 22° C aufgestellten Probe; mit der Zahl von 9100 Millionen Keime pro Kubikzentimeter wird hier der Rekord geschlagen. Das war voraussichtlich nur dadurch möglich, daß annähernd eine Reinkultur von Bacterium Güntheri vorhanden war.

Bei 37° C finden wir auch in dieser Serie wieder den Höhepunkt der Gasbildnerentwicklung (85 Proz.), während sonderbarerweise diesmal das Bacterium Güntheri gar nicht nachgewiesen werden konnte. An dessen Stelle ist ein schon in der frischen Konsummilch vorhandener Kokkus in einer relativen Vertretung von 15 Proz. erschienen. Ein deutlich bemerkbarer Einfluß auf die Bakterienflora hat im großen und ganzen durch die Impfung nicht stattgefunden.

Serie IX.

Einwirkung von gärender Kleie B, die angefeuchtet 48 Stunden bei 22° war, auf Konsummilch b.

Herstellung und Verarbeitung der Proben nach bekannter Methode. Benennung: M V a (37° C), M V b (22° C) und M V c (12° C).

Makroskopisches Aussehen:

M V a: Schon nach 16 Stunden feinflockig geronnen, schmale Serumzone, deutliche Gasbildung, Geschmack fade säuerlich; Säuregrad 10,1 n/10 NaOH.

M V b: Nach 40 Stunden, schön gallertig geronnen, kaum merkliche Gasbildung, Geschmack rein sauer; Säuregrad 12,2 n/10 NaOH.

M V c: Erst nach 5½ Tagen deutlich verändert, was durch eine 2 mm breite, schwachgelbliche Serumzone sich äußert, schwache Gasbildung, Geschmack säuerlich-bitter; Säuregrad 11,0 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahl (Zahlen in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M V a	240	180	60	310
M V b	1980	2000	1400	2080
M V c	1020	1600	600	1820

Qualitative Ergebnisse (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium coli	20	7	—	—	30	1
Bacillus mesentericus	—	—	10	—	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	50	3
Bacterium acidi lactici	190	62	20	1	90	5
Bacterium aërogenes	30	9	60	3	50	3
Bacterium Güntheri	30	9	2000	96	1600	88
Kokken	40	13	—	—	—	—
Gesamtzahl	310	100	2090	100	1820	100

Die Milch V a zeichnet sich durch einen verhältnismäßig niedrigen Keimgehalt aus; denn alle anderen bisher untersuchten Milchproben dieser Versuchsreihe, mit einziger Ausnahme der Milch I a, sind bakterienreicher. Bemerkenswert ist auch, daß auf Gelatineplatten die größte Keimzahl nachgewiesen werden konnte und zwar fast alles lauter Gasbildner mit typischem Wachstum. Auf den Agarplatten kamen dann zur Ergänzung nur einige Güntherikolonien dazu. Die Ursache des so vorzüglichen Wachstums bei Zimmertemperatur liegt wohl, zum Teil wenigstens, in der Anpassung der Flora an die betreffende Temperatur; 22° C war ja die Gärtemperatur des Impfmaterials.

Die Probe V b weist trotz der Impfung ebenfalls weniger Bakterien auf, als die nicht geimpfte Parallelprobe. Nur die Milch V c steht bezüglich des Keimgehaltes höher, als die analoge Kontrollmilch.

In bezug auf die einzelnen Spezies zeigt sich ganz genau dasselbe Bild, wie in den vorhergehenden Serien, nur mit etwas wechselnder quantitativer Vertretung. In Probe V a sind wieder die Gasbildner herrschend, besonders tritt Bacterium acidi lactici stark hervor. Kokken finden sich nur da, wo die Milch erst kurze Zeit in Gärung war. Es scheint, daß das Auftreten von Säurebildnern, besonders von Milchsäurebakterien, den Kokken ein rasches Ende bereitet oder daß ihnen die Milch als Nährmedium überhaupt nicht gut zusagt. Als interessant ist bei den Gelatineplatten noch hervorzuheben, daß die Coli- und die Acidi lactici-Kolonien vielfach ganz fremdartige Formen aufwiesen. Die Peripherie solcher Kolonien war typisch coli-ähnlich dünn gelappt, bläulich durchscheinend, während sich im Zentrum oft eine termitenhaufenförmige, acidi-aërogenes-ähnliche Anhäufung auftürmte.

In Probe V b und V c ist wieder, wie gewöhnlich, das Bact. Güntheri tonangebend, die Gasbildner sind nur noch in relativ bescheidener Zahl da.

Serie X.

Einwirkung von gärender Kleie B, die angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war, auf Konsummilch b.

Impfen und Verarbeiten der Proben wie üblich. Benennung: M VI a-Probe bei 37° C; M VI b-Probe bei 22° C; M VI c-Probe bei 12° C.

Vorprüfung:

M VI a: Schon nach 15 Stunden käsig-ziegerige Gerinnung, viel weißlich-getrübtes Serum, Geschmack fad-säuerlich; Säuregrad 10,9 n/10 NaOH.

M VI b: Nach 40 Stunden locker-gallertig geronnen, deutliche Gasbildung, gelblich-weiße, unscharf begrenzte Serumzone, Geschmack scharf sauer; Säuregrad 12,1 n/10 NaOH.

M VI c: Nach 4½ Tagen ganz feinflockig geronnen, beim Schütteln wieder flüssig erscheinend, schmale Serumzone, Geschmack: Stich ins Bittere; Säuregrad 10,3 n/10 NaOH.

Gesamtkeimzahlen (Zahlen in Millionen pro ccm).

Probe	Molken-gelatineplatten	Milchzucker-agarplatten	Milchzucker-agar hohe Schicht	Gesamt-zahl
M VI a	250	210	120	348
M VI b	2200	2300	1800	2240
M VI c	770	1000	800	1090

Qualitative Bestimmung (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M VI a		M VI b		M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	20	2
Bacterium putidum	—	—	—	—	40	4
Bacterium coli	8	2	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici	200	58	40	2	100	9
Bacterium aërogenes	130	37	100	4	30	3
Bacterium Güntheri	10	3	2100	94	900	82
Gesamtzahl	348	100	2240	100	1090	100

Auch hier haben wir eine relativ bescheidene Gesamtzahl von Bakterien in der bei 37° C aufgestellten Milch. In Probe VI b bewegt sich die Zahl in normalen Grenzen. Die Milch bei 12° C aber zeigt den weitaus geringsten Keimgehalt aller bei dieser Temperatur aufgestellten Proben.

Total verschwunden sind bei 37° C und 22° C die Fluoreszenten; nur bei 12° C vermochten sich dieselben noch in verhältnismäßig schwacher Beteiligung zu erhalten. Bacterium coli konnte bei 37° C noch knapp nachgewiesen werden; bei 22° und 12° C trat es ganz zurück. Bacterium acidi lactici und Bacterium aërogenes behaupteten sich in allen drei Proben der Serie. Die letztgenannte Art zeigt aber auch hier wieder deutlich die Tendenz mit abnehmender Temperatur sehr rasch zurückzutreten. Das Bacterium Güntheri erreicht sein Maximum auch hier bei 22° C.

Zusammenfassung der Hauptergebnisse aus der Untersuchung von Kleieprobe B.

a) Das Impfmaterial. (Vergl. p. 50, 51 u. 53.)

Keimgehalt der frischen Kleie = 13,5 Millionen pro g.

Bezeichnung	Kleie I a	Kleie I b	Kleie I c	Kleie I 1	Kleie I 2	Kleie I 3
Aufbewahrungstemp. .	37° C	37° C	37° C	22° C	22° C	22° C
Gärzeit	24 Std.	48 Std.	5 Tage	24 Std.	48 Std.	5 Tage
Absolute Keimzahl pro g frisches Material (Millionen)	3700	6750	3500	18 520	117 600	38 500
Vermehrungsquotient (gegenüber frischer Kleie)	274	500	259	1 372	8 711	2 852

b) Vergleich der Keimzahlen in den Milchproben.
(Zahlen in Mill. pro ccm.)

Temperatur in C	Kontrollmilch	Milch u. frisches Material	Milch geimpft m. Kleie B, die bei 37° C war:			Milch geimpft m. Kleie B, die bei 22° C war:		
			1 Tag	2 Tage	5 Tage	1 Tag	2 Tage	5 Tage
	Serie III	Serie IV	Serie V	Serie VI	Serie VII	Serie VIII	Serie IX	Serie X
Bei 37°	630	690	298	930	860	670	310	348
Bei 22°	2550	2400	2400	1960	2200	9100	2090	2240
Bei 12°	1470	1500	2980	2060	2680	1400	1820	1090

Schlußfolgerungen: Die früheste makroskopische Veränderung der Milch durch Kleinlebewesen, sowohl in geimpften als ungeimpften Proben, tritt stets bei 37° C ein; dies geschieht gewöhnlich schon nach 16—18 Stunden. Der Bakteriengehalt ist aber hier immer am kleinsten. Der maximale Keimgehalt einer Milch, sofort nach der makroskopischen Veränderung untersucht, findet sich in der Regel bei einer Aufbewahrungstemperatur von 22° C. Eine ständige Ausnahme bilden nach unseren Versuchen alle jene Proben, die mit Kleiematerial geimpft wurden, das bei 37° C kürzere oder längere Zeit in Gärung war.

Durch den Impfprozeß wird die Gesamtkeimzahl der Milch, falls diese bei einer Temperatur von über 20° C aufbewahrt wird, im allgemeinen nicht erhöht. In der Mehrzahl der Fälle ist der Bakteriengehalt der geimpften Milch sogar noch etwas geringer, als jener der Kontrollproben. Wird die Milch aber bei niedriger Temperatur aufbewahrt, so macht sich die Einwirkung der Impfung mit gärender Kleie ziemlich regelmäßig in einer erhöhten Gesamtkeimzahl der betreffenden Milch geltend.

c) Die wichtigsten Bakterienarten in Prozenten.

Bakterienart	Temperat. in C	Kontrollmilch	Milch + Material frisch	Milch + Impfmaterial b. 37° C aufbewahrt			Milch + Impfmaterial b. 22° C aufbewahrt		
				1 Tag	2 Tage	5 Tage	1 Tag	2 Tage	5 Tage
		Serie III	Serie IV	Serie V	Serie VI	Serie VII	Serie VIII	Serie IX	Serie X
Bact. fluorescens	37°	—	—	—	—	—	—	—	—
,, ,,	22°	3	13	—	—	—	—	—	—
,, ,,	12°	20	7	13	4	15	5	3	2
Bact. coli	37°	27	20	7	8	9	5	7	2
,, ,,	22°	18	—	4	1	—	—	—	—
,, ,,	12°	6	—	—	—	—	—	1	—
Bact. acidi lactici	37°	47	52	20	32	71	36	62	58
,, ,, ,,	22°	22	4	8	20	9	1	1	2
,, ,, ,,	12°	5	—	7	10	4	21	5	9
Bact. aërogenes	37°	—	12	60	54	18	44	9	37
,, ,,	22°	5	—	17	2	5	—	3	4
,, ,,	12°	—	—	13	3	3	—	3	3
Bact. Güntheri	37°	8	12	6	5	2	—	9	3
,, ,,	22°	52	83	71	77	86	99	96	94
,, ,,	12°	69	88	67	82	78	74	88	82

Ergebnisse: In bezug auf das makroskopische Bild der Veränderung sowohl der geimpften, wie der ungeimpften Milchproben ergibt sich aus unseren Versuchen folgendes:

Gerinnung der Milch bei 37° C in der Regel käsig-ziegerig, meist starke Blähung. Bei 22° C schön gallertige Gerinnung, Blähung ganz bedeutend zurücktretend oder fast ganz verschwindend; bei 12° C stets ganz feinflockige Gerinnung, häufig bitterer Geschmack.

Diesen Befunden entspricht auch die bezügliche Bakterienflora. Bei 37° C überwiegen in allen Proben die Gasbildner; sie nehmen im Durchschnitt aller Versuche 87 Proz. der Gesamtkeimzahl ein. Davon entfallen auf Bact. acidi lactici 47 Proz., also der weitaus größte Teil; auf Bacterium aërogenes rund 29 Proz. und auf Bacterium coli 11 Proz. Mit abnehmender Aufbewahrungstemperatur der Milch nehmen diese Gasbildner ebenfalls rasch ab. Bacterium coli und Bacterium aërogenes erscheinen in typischer Ausbildung weitaus am häufigsten in Milch, die bei 37° oder 12° C aufbewahrt wurde. Bacterium acidi lactici ist bei allen Temperaturen stets regelmäßig vertreten.

Während bei 37° C die Gasbildner vorherrschen, gelangt bei 22° und 12° C immer das Bacterium Güntheri ganz entschieden zur Vorherrschaft. Es bildet eine der Hauptursachen der großen Gleichförmigkeit in der Flora aller Milchproben.

Das Bacterium fluorescens entwickelt sich in der Milch meistens nur bei 12° C. Es muß nach unseren Erfahrungen öfters als die Ursache des Bittergeschmackes der Milch angesprochen werden.

Der Gärungsprozeß sowohl in den ungeimpften als in den geimpften Milchproben jeder Art läuft schließlich immer auf eine nahezu ausschließliche Milchsäuregärung, und zwar entweder auf eine reine Milchsäuregärung oder eine Gärung verbunden mit Gasproduktion, hinaus. Die reine Milchsäuregärung ist in der Emmentalerkäserei erwünscht, während die event. auftretende Gasproduktion nicht bloß unerwünscht ist, sondern der Fabrikation geradezu gefährlich werden kann.

Die Einwirkung der Impfung kann auch in bezug auf die Qualität der Mikroflora nicht als eine allgemein durchgreifende bezeichnet werden.

Im großen und ganzen decken sich die Untersuchungsergebnisse vorstehender Versuchsreihe mit Kleie B mit den Befunden bei Kleieprobe A.

4. Kleieprobe C.

Diese Probe ist, wie Probe B, ein feinkörniges Material. Dieselbe wurde am 4. November 1909 von der Futtermittelhandlung B. in Zürich abgeholt und am 6. November auf die übliche Weise verarbeitet. Aussehen normal, Qualität ziemlich gut. Die Untersuchung dieser, sowie der folgenden drei Proben wurde nicht so weit ausgedehnt, wie bei den Proben A und B. Es wurden mit Kleieprobe C folgende Versuche durchgeführt:

a) Untersuchung des frischen Materials.
b) Untersuchung der Kleie C, die angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war.
c) Untersuchung der Kleie C, die angefeuchtet 3 Tage bei 22° C war.
d) Wirkung des angefeuchteten, 24 Stunden bei 22° C gärenden Materials auf Milch.

a) Untersuchung des frischen Materials.

6. November 1909: 2 g des feinen Krüsches wurden mit 40 ccm sterilen Wassers gut zerrieben und aus der Aufschwemmung Kulturen von gewöhnlichen Gelatine- und Agarplatten sowie Traubenzuckeragar hohe Schicht angelegt in den Verdünnungen von $^1/_{10\,000}$—$^1/_{10\,000\,000}$.

12. November 1909. Untersuchungsresultate:

Bacillus mesentericus	300 000	=	4 %
Bact. herbicola aureum	5 300 000	=	78 %
Gelber Gasbildner	1 200 000	=	18 %
Gesamtzahl	6 800 000	=	100 %

In vorstehender Probe ist die absolute Zahl an Bakterien eine sehr große. Qualitativ jedoch tritt eine auffallende Artenarmut zutage. — Weit vorherrschend ist hier das von Düggeli beschriebene und benannte Bact. herbicola aureum, ein Nichtsporenbildner. Dieser Organismus macht 78 Proz., also beinahe $^4/_5$ der Gesamtflora aus. Es ist nicht schwer zu erklären, daß sich Bacterium herbicola aureum in größeren Mengen auf Kleie vorfindet; denn wie der genannte Autor nachwies, ist diese Art der häufigste Epiphyt auf Gräsern und überhaupt auf den meisten Futterpflanzen. Daß das Bacterium zur spezifischen Grasflora gehört, deutet schon dessen Name an. Mit der Getreidefrucht gehen nun die besonders den Spelzen anhaftenden Keime in die Mühle und gelangen beim Mahlen wohl zum größten Teil in die Kleie.

Außer Bacterium herbicola aureum findet sich in Probe C auch der für Milch und Molkereiprodukte nicht ganz harmlose gelbe Gasbildner Holliger in ansehnlicher Menge vor (18 Proz.); daneben in mehr bescheidener Zahl der Bacillus mesentericus.

b) Kleie C, angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C.

Am 7. November 1909 wurde die Probe angesetzt und am 8. November verarbeitet. Aussehen noch normal, Geruch schwach brenzlich, Verarbeitung wie gewöhnlich.

15. November 1909. Untersuchungsergebnisse:

Bakterienart	Gesamtkeimzahl pro g trockene Kleie		%
Bacterium fluorescens	200	Millionen	2
Bacillus mesentericus	100	„	1
Bacterium herbicola aureum	3000	„	32
Gelber Gasbildner	1500	„	16
Gelber Säurebildner	2000	„	21
Bacterium acidi lactici	2700	„	28
Total	9500	Millionen	100

Vor allem ist eine sehr starke Vermehrung der Gesamtkeimzahl festzustellen. Von 6,8 Millionen stieg die Menge der Keime pro Gramm auf 9500 Millionen, also um rund das 1400-fache. Dieses Verhältnis erscheint aber noch in ganz anderem Lichte, wenn wir fragen, welche Arten es hauptsächlich seien, die nun die Hauptmenge der Flora ausmachen. Wir untersuchen also das Zunahmeverhältnis der einzelnen

Arten: Die einzelnen Spezies haben sich in sehr verschiedenem Verhältnis entwickelt. Besonders auffallend ist die kräftige Vermehrung der Gasbildner, sowohl absolut als auch relativ. Ursprünglich mit 1,2 Millionen Keimen oder mit 18 Proz. der gesamten Flora der frischen Kleie vertreten, sind sie (gelber Gasbildner und Bacterium acidi lactici) innerhalb 24 Stunden auf 4200 Millionen gestiegen, was 44 Proz. der Gesamtkeimzahl entspricht. Dabei ist bemerkenswert, daß Bacterium acidi lactici im frischen Material unter der Menge der übrigen Keime gar nicht zur Geltung kam, nun aber in der gärenden Kleie 28 Proz. der gesamten Bakterienzahl und 64 Proz. der Gasbildner darstellt. Neben dieser neu auftretenden Art finden wir noch Bacterium fluorescens und den gelben Säurebildner Levy als Begleiter. Von den im frischen Krüsch nachgewiesenen Spezies wurde keine überwuchert oder unterdrückt. Alle drei haben sich absolut sehr bedeutend vermehrt, sind jedoch infolge Auftretens von neuen Arten prozentuell zurückgegangen. So ließ sich von Bacillus mesentericus eine 333-fache Vermehrung nachweisen; die relative Zahl aber sank von 4 auf 1 Proz. Bacterium herbicola aureum zeigt eine Zunahme von über das 560-fache, ging aber prozentuell von 78 auf 32 zurück. Von der Ursprungsflora behauptete sich der gelbe Gasbildner Holliger, trotzdem die Wachstumsbedingungen für ihn nicht optimale waren, am relativ besten, indem die bezügliche Vermehrungsziffer rund das 1250-fache beträgt. Aber trotzdem ging diese Art in der relativen Vertretung einen kleinen Schritt zurück, nämlich von 18 auf 16 Proz. Dieser gelbe Gasbildner im Verein mit dem fast explosionsartigen Auftreten des Bacterium acidi lactici, diesem so häufigen Blähungserreger, kann für die Milch keineswegs als harmlos bezeichnet werden.

c) Kleieprobe C, angefeuchtet 3 Tage bei 22° C.

Makroskopisches Aussehen der Probe: Stark gebräunt; Geruch sehr stark brenzlich, deutlich nach Ammoniak; mit Salzsäure starke Dämpfe. Anlegen der Kulturen wie üblich.

Untersuchungsresultate:

Art	Keimzahl absol. pro g trock. Kleie		Keime in %
Bacterium coli	1 000 Mill.	=	1
Bacterium fluorescens	62 000 „	=	38
Bacterium putidum	2 000 „	=	1
Bacterium acidi lactici	22 000 „	=	13
Gelber Gasbildner	1 000 „	=	1
Gelber Säurebildner	1 000 „	=	1
Bacterium punctatum	22 000 „	=	13
Unbekanntes Stäbchen (Unb. 1) . .	53 000 „	=	32
Total . .	164 000 Mill.	=	100

Von 6,8 Millionen stieg die Keimzahl innerhalb 3 Tagen auf 164 000 Millionen, also um rund das 24 100-fache. Die Ursprungsflora ist nur mehr sehr schwach vertreten; denn sie repräsentiert kaum mehr ¾ Proz. des nunmehrigen Bakteriengehaltes. Es ist also in 3 Tage altem Krüsch gegenüber dem frischen eine sehr starke Verschiebung in der Mikroflora eingetreten. Von den 3 Arten, die wir im frischen Krüsch gefunden haben, sind zwei: Bacillus mesentericus und Bacterium herbicola aureum nicht mehr nachweisbar. Die letztgenannte Art war in der Kleie, die 24 Stunden bei 22° C gegoren hatte, noch ein Hauptvertreter; einzig der gelbe Gasbildner ist noch in relativ schwacher Zahl vorhanden.

Als Ersatz für diese verschwundenen oder von anderen überwucherten Arten trat eine ganze Reihe neuer Spezies auf. Unbekannt 1, ein Stäbchen, das einen intensiven scharfen Geruch erzeugt, beansprucht 53 Milliarden oder 32 Proz. des Florenbestandes. Diese plötzlich auftretende Bakterie, die weder im frischen, noch in 24 Stunden altem Material in nachweisbarer Menge vorhanden war, scheint im angefeuchteten Krüsch bei 22° C optimale

Wachstumsbedingungen gefunden zu haben. Zum ersten Male zeigte sich auch Bacterium coli; ferner wurden nachgewiesen: Bacterium putidum und Bacterium punctatum. Diese 4 neuen Spezies, die sich vom Ende des ersten bis zum dritten Tage zugesellten, machen 47 Proz., also nahezu die Hälfte der nunmehrigen Keimzahl aus.

Am kräftigsten entwickelte sich von den nach 24 Stunden nachweisbaren Arten das Bacterium fluorescens, dessen Zahl von 200 Millionen auf 62 000 Millionen, also ums 310-fache stieg. Daran schließt sich Bacterium acidi lactici an. Die 2 übrigen, dem 24 Stunden alten und dem 3 Tage alten Material noch gemeinsame Arten, der gelbe Gasbildner und der gelbe Säurebildner haben nicht nur keine Vermehrung erfahren, sondern vermochten nicht einmal die nach 24 Stunden inne gehabte, entwicklungsfähige Keimzahl bis zum Ende des dritten Tages zu behaupten.

d) Wirkung des angefeuchteten, 24 Stunden bei 22° C gärenden Materials auf Milch.

α) Sterile Milch, geimpft mit angefeuchtetem Krüsch C, das 24 Stunden bei 22° C war.

100 ccm der durch Wärme sterilisierten Milch wurden mit $^1/_{100}$ g des gärenden Materials geimpft und nach 24 Stunden bei 22° Aufbewahrungstemperatur untersucht.

9. November 1909. Milch nicht deutlich verändert; Geschmack schottenartig, süßlich; Säuregrad 5,1 n/10 NaOH.

Untersuchungsergebnisse:

Bakterienart	absolute Zahl pro ccm Milch		%
Bacterium fluorescens	2 Millionen	=	1
Bacillus mesentericus	1 „	=	1
Bacterium coli	10 „	=	8
Bacterium acidi lactici	7 „	=	5
Gelber Gasbildner	93 „	=	67
Bacterium Güntheri	25 „	=	18
Total . .	138 Millionen	=	100

In 100 ccm Milch wurden 95 Millionen Keime gebracht ($^1/_{100}$ g Material). Die Impfung beträgt also pro ccm 950 000 Keime. Nach 24 Stunden war die Keimzahl von 0,95 Millionen auf 138 Millionen angewachsen, also um rund das 145-fache. Hinsichtlich der Arten zeigte sich eine im allgemeinen ziemlich weitgehende Übereinstimmung in der Flora des Impfmaterials und derjenigen der geimpften Milch. Doch hat auch hier offenbar der „Kampf ums Dasein“ einigen Arten, denen die neuen Existenzbedingungen nicht zusagten, den Untergang gebracht. Bacterium herbicola aureum ist ganz verschwunden, trotzdem diese Art im Impfstoff mit 32 Proz. der bezüglichen Flora vertreten war. Ein ähnliches Schicksal ereilte den gelben Säurebildner. Rechnen wir diese beiden, im Impfmaterial reichlich vorhandenen, in der geimpften Milch aber nicht in größerer Menge zur Entwicklung gekommenen Arten ab, so beläuft sich die in die sterilisierte Milch pro ccm eingeimpfte Keimzahl auf 0,45 Millionen; der durchschnittliche Vermehrungsquotient ist dann nicht 145, sondern über 300. An Stelle der beiden

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

nicht mehr nachweisbaren Arten sind 2 neue in ziemlich starker Zahl aufgetreten, nämlich Bacterium coli und Bacterium Güntheri. Letztere Spezies macht schon 18 Proz. aus und würde ohne Zweifel in kurzer Zeit alles überwuchert haben. Bacillus mesentericus und Bacterium fluorescens sind nur noch in bescheidener Menge vorhanden und haben sich nicht bedeutend vermehrt. Auffallend ist endlich die starke Entwicklung der Gasbildner. Bacterium acidi lactici repräsentiert 5 Proz., Bacterium coli 8 Proz. und der gelbe Gasbildner 67 Proz. der gesamten Mikroflora, so daß also die Gasbildner allein 80 Proz. oder $^4/_5$ der gesamten Keimzahl ausmachen.

β) Gewöhnliche Konsummilch, geimpft mit Kleie C, die angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war; Probe zu 22° C gestellt.

Die als Nährmedium benutzte Konsummilch war gewöhnliche Marktmilch und wurde wie Probe α in der Menge von 100 ccm mit $^1/_{100}$ g gärender Kleie geimpft. Schon nach 22 Stunden zeigte die Milch deutliche gallertige Gerinnung mit ziemlicher Serumausscheidung, während die Kontrollmilch noch ganz intakt war. Das Gerinnsel schwamm über der ca. 1 cm hohen, wässerig-trüben Serumzone; zahlreiche Gasblasen waren sichtbar. Säuregrad 14,1 n/10 NaOH.

Die angelegten Kulturen zeigten folgende Flora:

Bacterium acidi lactici	10	Millionen =	1 %
Bacterium Güntheri	1320	„ =	62 %
Gelber Gasbildner	800	„ =	37 %
Zusammen . .	2130	Millionen =	100 %

Die Kontrollmilch.

Herkunft wie Milch β; jedoch wurde keine Impfung vorgenommen. Nach 48 Stunden bei 22° C zeigte die Kontrollmilch schöne, gallertige Gerinnung, Serumzone fehlt, ganz schwache Gasbildung ist vorhanden. Geschmack normal säuerlich; Säuregrad 13,1 n/10 NaOH.

Untersuchungsresultate:

Bacterium acidi lactici	10	Millionen =	1 %
Bacterium Güntheri	1370	„ =	99 %
Zusammen . .	1380	Millionen =	100 %

Wie ein Vergleich der beiden Milchproben zeigt, ist die geimpfte Milch β ganz bedeutend bakterienreicher, als vorstehende Kontrollmilch, nämlich ungefähr um 54 Proz. In der geimpften Milch vermochten von den 6 eingeimpften Spezies nur 2 Gasbildner aufzukommen. Alles weit überwuchernd trat in beiden Proben das Bacterium Güntheri in den Vordergrund. Die Impfung macht sich hauptsächlich in der augenscheinlichen Vermehrung der Gasbildner geltend. Im allgemeinen aber zeigt uns der Versuch, daß die Zufuhr von Bakterien durch kleine Mengen von gärendem Krüsch die Flora einer schon an Milchsäurebakterien relativ reichen Milch viel weniger zu beeinflussen vermag, als dies bei einer frischen, reinlich gewonnenen Milch der Fall ist.

5. Kleieprobe D.

Das Untersuchungsmaterial, grobe Kleie, wurde am 4. November 1909 von der Handlung B. in Z. abgeholt und am 6. November in üblicher Weise verarbeitet. Aussehen der Probe normal, Qualität gut. — Die Versuchsserie umfaßt folgende einzelne Versuche:

a) Material frisch untersucht.
b) „ angefeuchtet, 24 Stunden bei 22° C.
c) „ „ 3 Tage bei 22° C.
d) Sterile Milch, geimpft mit Kleie D frisch; geimpfte Milch zu 22° C gestellt und nach 24 Stunden untersucht.
e) Gewöhnliche Konsummilch geimpft mit Material sub b, inklusive Kontrollprobe.

a) Das frische Material.

Herstellung der Kulturen und Untersuchung derselben wie üblich.

Untersuchungsresultate:

	Keimzahlen pro g		
Bacillus mesentericus	100 000	=	1 %
Bacterium fluorescens	100 000	=	1 %
Bacterium acidi lactici	300 000	=	4 %
Gelber Gasbildner	2 000 000	=	24 %
Gelber Säurebildner	200 000	=	3 %
Bacterium herbicola aureum	500 000	=	6 %
Unbekannt 2, verflüssigend	5 000 000	=	61 %
Summa	8 200 000	=	100 %

b) Material angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C.

Herstellung der Probe wie üblich am 7. November 1909. Nach 24 Stunden war das makroskopische Aussehen noch normal, Geruch schwach muffig.

Untersuchungsergebnis:

	Keimzahlen pro g grobe, trockene Kleie			
Bacterium fluorescens	400	Millionen	=	3 %
Bacterium coli	400	„	=	3 %
Bacterium acidi lactici	7 200	„	=	51 %
Gelber Gasbildner	3 600	„	=	29 %
Bacterium herbicola aureum	1 800	„	=	14 %
Gesamtzahl	13 400	Millionen	=	100 %

Innerhalb 24 Stunden hat sich die Bakterienzahl um rund das 1634-fache vermehrt. 13 400 Millionen Keime pro Gramm ist entschieden eine bedenklich hohe Zahl.

Die einzelnen Arten verhielten sich in ihrer Vermehrungsintensität ganz verschieden. Bacillus mesentericus, der im frischen Material in bescheidener Menge (1 Proz.) nachweisbar war, hat sich entweder gar nicht oder doch in einem relativ langsamen Tempo vermehrt, so daß ein Nachweis nach 24-stündiger Gärung nicht mehr möglich war. Es ist kaum anzunehmen, daß dieser Sporenbildner schon nach dieser kurzen Gärdauer abgetötet, resp. keimunfähig war. Im Gegensatz zu Bacillus mesentericus trat das Bacterium coli, das im frischen Material nicht nachgewiesen werden konnte, nun deutlich hervor. Das gleiche Schicksal wie der Kartoffelbacillus ereilte den gelben Säurebildner und die in der frischen Kleie weit überwiegende Art Unbekannt 2. Diese letztere, obwohl im trockenen Material 61 Proz. beanspruchend, wurde durch andere Arten rasch überwuchert. Während der 24-stündigen Gärung sind im ganzen 5,3 Millionen oder 65 Proz. der Ursprungsflora verschwunden; so daß bloß 2,9 Millionen oder 35 Proz. als eigentliches Ausgangsmaterial für die 13 400 Millionen Keime des angefeuchteten Krüsches in Betracht fallen.

Die in der frischen Kleie vorhandenen Arten, die wir im gärenden Material wiederfinden, haben sich nun verschieden stark vermehrt.

Am kräftigsten entwickelte sich Bacterium acidi lactici; die Erhöhung der Keimzahl pro Gramm beträgt rund das 24 000-fache, während Bacterium herbicola aureum eine 3600-fache, Bacterium fluorescens eine 4000-fache und der gelbe Gasbildner eine 1800-fache Vermehrung aufweisen. Die Gefährlichkeit der Arten, speziell für Milch, erhöht sich also; denn in der frischen Kleie machen die Gasbildner nur 28 Proz. des gesamten Keimgehaltes, im gärenden Material aber volle 83 Proz. aus.

c) Material angefeuchtet 3 Tage bei 22° C.

Die für den Versuch verwendete Menge Kleie betrug 4,91 g. Dies entspricht, wie bei allen früheren Proben, 2 g trockenem Material. — Die angefeuchtete Kleie zeigte nach 3 Tagen einen brenzlichen Geruch; mit Salzsäure waren deutliche Ammoniakdämpfe wahrnehmbar, während die Farbe des Untersuchungsmaterials ziemlich ins Braune übergegangen war. Verarbeitung der Probe wie üblich.

Ergebnisse:

	Keimzahlen pro g trockene Kleie			
Bacillus mesentericus	3 000	Millionen	=	2 %
Bacterium fluorescens	81 000	„	=	51 %
Bacterium acidi lactici	53 000	„	=	34 %
Unbekannt 1	20 000	„	=	13 %
Gesamtzahl	157 000	Millionen	=	100 %

Von den im frischen Material nachgewiesenen 7 Bakterienarten sind in der 3 Tage in Gärung belassenen Kleie, wie aus einem Vergleiche der vorstehenden Untersuchungsresultate mit der auf p. 72 angegebenen Mikroflora zu ersehen ist, nur noch 3 Arten in einer zum Nachweis genügenden Menge vorhanden, nämlich Bacillus mesentericus, Bacterium fluorescens und Bacterium acidi lactici. Die 3 genannten Arten konnten im frischen Material in einer Menge von zusammen 0,5 Millionen pro Gramm nachgewiesen werden. Der Keimgehalt der vorstehend untersuchten, 3 Tage in Gärung belassenen Probe beträgt 157 000 Millionen. Demnach resultiert ein Vermehrungsquotient von 314 000.

Von den Arten des frischen Materials sind nicht mehr nachzuweisen: Unbekannt 2, Bacterium herbicola aureum, der gelbe Gasbildner und der gelbe Säurebildner. Gegenüber der Flora des 24 Stunden alten Krüsches fehlen in vorstehender Probe Bacterium coli, Bacterium herbicola aureum und der gelbe Gasbildner. In dem 24 Stunden alten Material ist zwar Bacillus mesentericus nicht mehr nachweisbar, obwohl er im frischen Krüsch vorhanden war. Dagegen

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

taucht er nach 3 Tagen wieder auf. Neu hinzu kommt die Art Unbekannt 1. Ein Vergleich des 3 Tage alten Materials mit dem frischen zeigt folgende Vermehrungsziffern für die einzelnen Arten: Bacterium fluorescens hat sich ums 810 000-fache vermehrt, Bacillus mesentericus ums 30 000-fache, Bacterium acidi lactici ums 177 000-fache. Gegenüber der Bakterienzahl des 24 Stunden alten Materials hat sich Bacterium fluorescens verzweihundertfacht, Bacterium acidi lactici versiebenfacht. Die Gasbildner inklus. Unbekannt 1 sind im 3 Tage alten Material mit 73 000 Millionen oder 47 Proz. der Gesamtflora vertreten, gegenüber 11 200 Millionen oder 83 Proz. des Gesamtgehaltes im 24 Stunden alten gärenden Krüsch und 2,3 Millionen oder 28 Proz. der Gesamtflora des frischen Materials.

Bei der 3 Tage alten Probe hat gegenüber dem 24 Stunden alten Krüsch eine absolute Zunahme der Gasbildner, aber eine prozentische Abnahme derselben stattgefunden. Verflüssigende Arten fanden sich in der frischen Kleie im ganzen 5,2 Millionen oder 63 Proz. des gesamten Keimgehaltes; in der während 24 Stunden in Gärung belassenen Probe aber ließ sich nur mehr das Bacterium fluorescens nachweisen und zwar in einer Menge von 400 Millionen pro Gramm. Diese große absolute Zahl macht hier jedoch nur 3 Proz. des Keimgehaltes aus. Es fand also auch bei den peptonisierenden Arten eine absolute Zunahme, aber eine relative prozentische Abnahme während der Gärdauer statt. Eine starke relative wie absolute Vermehrung haben die Verflüssigenden im 3 Tage alten Material aufzuweisen; indem dieselben hier mit 84 000 Millionen 53 Proz. des gesamten Keimgehaltes erreichen. Die weitaus wichtigste Rolle kommt hier dem Bacterium fluorescens zu.

d) Sterile Milch geimpft mit Kleieprobe D frisch.

Dieser Versuch wurde namentlich deshalb angestellt, um zu erfahren, welche im frischen Krüsch vorhandenen Bakterien vorherrschend zur Entwicklung gelangen, wenn die Flora der Milch selbst zum vorhinein ausgeschaltet wird.

Die Herstellung der sterilen Milch geschah in der früher angegebenen Art und Weise. Die geimpfte Milch wurde zu 22° C gestellt und nach 24 Stunden untersucht; das makroskopische Aussehen war noch ziemlich normal, der Geschmack süßlich-schottenartig; Säuregrad 5,4 n/10 NaOH.

Untersuchungsresultate:

	Keimzahl pro ccm Milch		
Bacterium fluorescens	2 770 000	=	3 %
Bacterium coli	1 000 000	=	1 %
Bacterium acidi lactici	54 100 000	=	68 %
Gelber Gasbildner	6 000 000	=	7 %
Bacterium herbicola aureum	10 000 000	=	13 %
Bacterium Güntheri	6 000 000	=	8 %
	79 870 000	=	100 %.

Der Vergleich dieser Mikroflora mit jener des frischen Impfmaterials (vgl. p. 72) zeigt, daß Bacillus mesentericus, der gelbe Säurebildner und Unbekannt 2 in der sterilen Milch nicht zur Entwicklung gelangten. Dagegen weisen von den vorhandenen Arten Bacterium fluorescens, der gelbe Gasbildner, ferner Bacterium acidi lactici und Bacterium herbicola aureum eine sehr starke

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Vermehrung auf. Insbesondere gilt dies von Bacterium acidi lactici. Als ursprünglich in der frischen Kleie nicht nachweisbar, aber doch darin enthalten, entwickelten sich in der sterilen Milch Bacterium coli und Bacterium Güntheri.

e) Konsummilch geimpft mit Kleieprobe D, angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C inklusive Kontrollprobe.

Über die Zusammensetzung des Impfmaterials siehe p. 72. Die zur Prüfung verwendete Konsummilch war gewöhnliche Durchschnittsmarktmilch, wie sie von Händlern Zürichs ausgemessen wird. Als gleichzeitig aufgestellte Kontrollmilch diente die für die Versuchsreihe bei Kleieprobe C verwendete Milch, da beide Versuchsreihen gleichzeitig durchgeführt wurden.

Die geimpfte Konsummilch zeigte schon nach 21 Stunden bei 22° C die ersten Anzeichen makroskopischer Veränderung, während die parallele Kontrollprobe erst nach 48 Stunden verändert war. Die geimpfte Milch wies kompakte gallertig-ziegerige Gerinnung auf und zeigte deutliche Blähung, die Kontrollprobe dagegen war normal gallertig geronnen. Doch waren Geschmack und Geruch der geblähten Milch ziemlich normal; der Säuregrad betrug 14,1 n/10 NaOH. Es fanden sich in der geimpften Milch nur 2 Bakterienarten vor, nämlich:

Bacterium acidi lactici	200 Mill.	=	9 %
Bacterium Güntheri	2000 „	=	91 %
	2200 Mill.	=	100 %

Ein Vergleich vorstehender Milchprobe mit der Kontrollmilch (p. 71) als Parallelprobe zeigt uns, daß die Keimzahl der mit gärender Kleie geimpften Milch wohl etwas höher als jene der nicht geimpften Milch ist. Die Arten jedoch wurden durch die Impfung nicht sehr stark beeinflußt. Immerhin ist die Zahl der Gasbildner auf Kosten der Nichtgasbildner erheblich gestiegen. Mit Ausnahme des Bact. acidi lactici gingen aber in der offenbar schon bei der Verwendung an Güntheri reichen Milch alle anderen Arten von Bakterien des gärenden Krüsches rettungslos zugrunde oder konnten sich zum mindesten nicht entwickeln. Frisch gemolkene, speziell an Güntheri ärmere Milch, hat, wie wir früher gesehen, ein ganz anderes Resultat ergeben, nämlich deutliche Beeinflussung der Milchflora durch den Bakteriengehalt des gärenden, eingeimpften Krüsches.

Zusammenstellung der Hauptuntersuchungsergebnisse von Kleieprobe C und D.

Probe C.

Bakterienart	Material frisch	Material 24 Std. bei 22° C	Material 3 Tage bei 22° C	Sterile Milch + Material 24 Std. bei 22° C	Konsummilch + Material 3 Tage bei 22° C
Gesamtzahl an Bakt. in Mill. pro g	6,8	9500	164 000	138	2130
Davon sind in %:					
Bacterium fluorescens	—	2	38	1	—
Bacillus mesentericus.	4	1	—	1	—
Coli-aërogenes-Gruppe	—	28	14	13	1
Gelber Gasbildner	18	16	1	67	37
Bacterium herbicola aureum . .	78	32	—	—	—
Bacterium Güntheri	—	—	—	18	62

Probe D.

Bakterienart	Material frisch	Material 24 Std. bei 22° C	Material 3 Tage bei 22° C	Sterile Milch + frisches Material D	Konsummilch + Material D 24 Std. bei 22° C
Gesamtzahl an Bakt. in Mill. pro g	8,2	13 400	157 000	79,87	2200
Davon sind in %:					
Bacterium fluorescens	1	3	51	3	—
Bacillus mesentericus	1	—	2	—	—
Coli-aërogenes-Gruppe	4	54	34	69	9
Gelber Gasbildner	24	29	—	7	—
Bacterium herbicola aureum	6	14	—	13	—
Bacterium Güntheri	—	—	—	8	91

Vorstehende Übersicht zeigt uns vorerst eine ziemliche Ähnlichkeit in der Zusammensetzung der Flora der beiden frischen Kleieproben. Alle 3 in der Probe C enthaltenen Arten kommen, wenn auch in anderen Zahlenverhältnissen, in Probe D ebenfalls vor. Hier treten aber noch 2 andere Mikroorganismen hinzu, wovon die gasbildenden Milchsäurebakterien die wichtigeren sind.

In den beiden 24 Stunden alten gärenden Proben ist die Übereinstimmung sehr auffallend. Die 4 gemeinsam vorkommenden Hauptvertreter machen bei Probe C 78 Proz., bei Probe D sogar den vollen Bestand (100 Proz.) aus. Die Schaffung gleicher oder doch ganz ähnlicher Lebensbedingungen durch Herstellung gleicher Temperaturen und Feuchtigkeitsverhältnisse hat hier ganz deutlich eine Konvergenz in der Zusammensetzung der Flora bedingt. Weit vorherrschend sind beiderorts die Gasbildner. Ganz analoge Verhältnisse finden wir bei dem 3 Tage alten Material beider Kleieproben. Hauptvertreter aber ist Bacterium fluorescens; daneben gelangten auch die Gasbildner zu bedeutender Entwicklung.

In steriler Milch tritt die Auslese wenn möglich noch entschiedener zutage, namentlich mit zunehmendem Alter der Milchproben. In der sterilisierten, mit Kleie C geimpften Milch finden sich insgesamt 6, in der mit frischem Material geimpften Probe D, 5 verschiedene Bakterienspezies, von denen 4 beiden Proben gemeinsam sind. Beiderorts gewann die Gruppe der Gasbildner das erdrückende Übergewicht. Die geimpften Konsummilchproben sowohl bei der Versuchsreihe C wie D weisen deutlich darauf hin, daß das schon reichlich in der Milch vorhandene Bacterium Güntheri trotz des Einsaatmaterials, das überwiegend Gasbildner enthält, noch entschieden die Oberhand behalten hat.

6. Kleieprobe E.

Die Probe war grobflockiges Material; sie wurde am 4. November 1909 von der Mehlhandlung S. in Zürich I bezogen und sofort verarbeitet. Mit dieser Kleie, die ganz normal und frisch aussah, wurden folgende einzelne Versuche durchgeführt:

a) Untersuchung des Materials frisch.
b) " " " angefeuchtet nach 12 Stunden bei 22° C.
c) " " " " nach 2 Tagen bei 22° C.
d) Sterile Milch geimpft mit frischem Material.

a) Frische Kleieprobe E.

Verarbeitung des Materials und Untersuchung der Kulturen wie gewöhnlich. Über das Untersuchungsergebnis gibt folgende Zusammenstellung Aufschluß. Es wurden nachgewiesen pro Gramm Kleie:

	Anzahl		%
Bacterium fluorescens	200 000	=	2
Bacterium acidi lactici	200 000	=	2
Gelber Gasbildner.	2 500 000	=	22
Bacterium herbicola aureum	8 500 000	=	74
	11 400 000	=	100

Trotzdem das frische Futtermittel ganz normal aussah, also weder in der Farbe noch im Geruch irgendwie verdächtig erschien, enthielt es doch pro Gramm 11,4 Millionen Keime. Im ganzen konnten nur 4 Spaltpilzarten isoliert werden. Das weitaus größte Kontingent an Keimen stellte diesmal das auch früher schon öfters aufgetretene Bacterium herbicola aureum (74 Proz.). Daneben erschienen auch typische Gasbildner, wie Bacterium acidi lactici und der gelbe Gasbildner. Von nur untergeordneter Bedeutung ist Bacterium fluorescens.

b) Kleieprobe E, angefeuchtet 12 Stunden bei 22° C.

Die Gärung wurde am 7. November durch Vermischen von 20 g Kleie mit 40 ccm sterilem Wasser auf die übliche Weise eingeleitet. Nach 12 Stunden zeigte die Masse makroskopisch noch ein ganz normales Aussehen. Nur der Geruch war schwach teigartig. Die Flora aber hatte innerhalb der 12 Stunden eine bedeutende Veränderung erfahren und zeigte nun folgendes Bild:

	Bakteriengehalt pro g trockenes Material			
Bacterium fluorescens	3	Millionen	=	5 %
Bacterium punctatum	2	„	=	3 %
Gelber Gasbildner.	38	„	=	62 %
Bacterium herbicola aureum	8	„	=	13 %
Unbekannt 1	10	„	=	17 %
Zusammen . .	61	Millionen	=	100 %.

Die Zahl ist auch hier, wie bei den Proben von Kleie C und D, die aber 24 Stunden gärten, sehr bedeutend. Sie stieg von 11,4 auf 61 Millionen. Doch ist diese Vermehrungsschnelligkeit gegenüber dem später eingeschlagenen Tempo nur eine bescheidene; es mußte auch hier, wie anderswo, zuerst eine gewisse Anpassung an die neuen Verhältnisse vor sich gehen.

Durch das Gären bei 22° C während 12 Stunden ist eine ganz bedeutende Verschiebung im Artenbestand zu verzeichnen. Ganz verschwunden, resp. nicht mehr in nachweisbarer Zahl vorhanden, ist Bacterium acidi lactici. Neu aufgetreten sind Bacterium punctatum und Unbekannt 1. Beide Spezies machen zusammen nur 20 Proz. der gesamten Keimzahl aus, so daß die Ursprungsflora sich immer noch auf $^4/_5$ der Bakterienmenge beläuft. Prozentuell sehr stark zurückgegangen ist Bacterium herbicola aureum, das von 74 auf 13 Proz. sank. Überhaupt scheint diese Art nach ca. 2 Tagen fast immer total eliminiert zu werden, trotzdem sie sich in der ersten Zeit der Gärung nicht selten noch ganz bedeutend entwickeln kann. Wieder sind es die Gasbildner, welche die stärkste Entwicklung zeigen. Nur in untergeordneter Weise vermehrte sich Bacterium fluorescens.

c) Kleieprobe E angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C.

Die Probe wurde am 8. November 1909 angesetzt und am 10. November verarbeitet. Die Farbe des Krüsches war während der eintägigen Gärdauer etwas verblichen, der Geruch schwach muffig-faulig. Die Untersuchung ergab folgende Flora:

	pro g trockene Kleie		
Bacterium fluorescens	5 000 Millionen	=	6 %
Bacterium coli	2 000 „	=	2 %
Bacterium acidi lactici	3 000 „	=	4 %
Gelber Gasbildner.	2 000 „	=	2 %
Gelber Säurebildner	3 000 „	=	4 %
Bacterium punctatum	43 000 „	=	52 %
Unbekannt 1	25 000 „	=	30 %
	83 000 Millionen	=	100 %.

d) Sterile Milch, geimpft mit frischer Kleie E.

Wie früher bei Probe C und D, so wurden auch hier 100 ccm sterile Milch bei 22° C mit $^1/_{100}$ g frischer Kleie geimpft und die Milch nach 24 Stunden untersucht. Ein Tröpfchen der Milch, als Präparat im hängenden Tropfen untersucht, zeigte lauter Stäbchen verschiedenster Dimensionen. Die angelegten Kulturen wiesen folgende vier Bakterienarten auf:

	pro ccm Milch		
Bacillus mesentericus.	300 000	=	2 %
Bacterium coli	800 000	=	4 %
Bacterium acidi lactici	3 000 000	=	14 %
Gelber Säurebildner	16 600 000	=	80 %
	20 700 000	=	100 %.

Im angefeuchteten Material stieg die Keimzahl innerhalb 48 Stunden von 11,4 Millionen auf die gewaltige Zahl von 83 000 Millionen pro Gramm. Die Vermehrung betrug demnach in dieser relativ kurzen Zeit ungefähr das 7280-fache. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, daß von der Ursprungsflora kaum mehr als 26 Proz. für die Bakterienmenge des 48 Stunden alten Krüsches als Ausgangsmaterial dienten; denn das in der frischen Probe mit 74 Proz. vorhandene Bacterium herbicola aureum ist nicht mehr nachweisbar. An seine Stelle sind andere Spezies getreten, so daß die 83 Milliarden Bakterien eigentlich nicht aus 11,4 Millionen, sondern aus der mehr als dreimal kleineren Zahl von nur 2,9 Millionen Keimen hervorgegangen sind. In Wirklichkeit haben wir also eine reichlich 28 600-fache Vermehrung.

Was die einzelnen Arten betrifft, so ist gegenüber dem frischen Material nur Bacterium herbicola aureum, das schon im 12 Stunden alten Substrat von 74 auf 13 Proz. zurückgegangen war, nicht mehr nachweisbar. Offenbar ist diese spezifische Grasbakterie säurefliehend, da sie um so mehr in den Hintergrund zu treten scheint, je stärker die Säurebildner zu überwuchern beginnen. Ziemlich vorherrschend werden nun peptonisierende Arten, besonders Bacterium fluorescens, das sich innerhalb zweier Tage von 0,2 Millionen auf 5000 Millionen vermehrte, also ums 25 000-fache. Von besonderer Bedeutung ist als eiweißlösende Spezies auch Bacterium punctatum, das im frischen Substrat wegen zu spärlicher Zahl nicht nachweisbar war. Nach 12 Stunden aber beteiligte es sich schon mit 2 Millionen = 3 Proz. an der Flora, und nach weiteren 36 Stunden hatte diese Art alle Konkurrenten weit überflügelt, indem sie nun 52 Proz. des Gesamtbestandes ausmachte. Ganz ähnlich wie Bacterium punctatum verhielt sich Unbekannt 1, nur mit dem Unterschiede, daß hier die zweite, 36 Stunden umfassende Gärzeit, nicht so große Vermehrungsintensität zu bedingen vermochte. Den Rest der Flora bilden, mit Ausnahme von 4 Proz., die sich in letzter Stunde noch der gelbe Säurebildner erobern konnte, ausschließlich nur Gasbildner. Am wichtigsten hiervon ist Bacterium acidi lactici, das wohl im frischen Material schwach vertreten war (2 Proz.), im 12 Stunden alten Material nicht mehr aufkam und erst als die Säurebildner überhaupt das Übergewicht zu erobern begannen, sich bis zu 3 Milliarden pro Gramm zu entwickeln vermochte. Bacterium coli trat nach 48 Stunden ebenfalls in kleiner Menge hervor, während der gelbe Gasbildner von Anfang an absolut beständig zunahm, relativ aber nach 12-stündiger Gärung einen sehr starken Rückgang aufweist.

In die sterile Milch wurden pro Kubikzentimeter 1140 Keime eingeimpft. Die Untersuchung nach 24 Stunden wies 20,7 Millionen Keime pro Kubikzentimeter aus. Die Vermehrung beträgt also das 18 160-fache.

Bedeutend abweichend ist die Zusammensetzung der Bakterienflora der Milch von jener des Impfmaterials, ein deutlicher Beweis, wie das Nährmedium die Entwicklung der einzelnen Arten sehr stark beeinflußt. Von den im Impfmaterial nachgewiesenen Spezies fand sich einzig Bacterium acidi lactici wieder. Die anderen drei Arten, die in der Milch zum Vorschein kamen, waren im frischen Krüsch so spärlich vorhanden, daß ein Nachweis mittels der im übrigen sich sehr bewährenden Verdünnungsmethoden und den gewöhnlichen Nährböden nicht gelang. — Neben dem bereits erwähnten Bacterium acidi lactici findet sich in auffallend großer Menge der gelbe Säurebildner (80 Proz.!), ferner traten auch das typische Bact. coli und in bescheidener Menge Bacillus mesentericus auf.

7. Kleieprobe F.

Probe F war eine feinflockige Kleie. Sie wurde am 12. November 1909 von der Handlung E. Schaffhauserstraße, Zürich, abgeholt und am gleichen Tage verarbeitet. Aussehen der Probe normal. Die Untersuchung wurde in folgender Ausdehnung durchgeführt:

a) Untersuchung der frischen Probe.
b) „ der angefeuchteten Probe nach 12 Stunden bei 22° C.
c) „ der angefeuchteten Probe nach 2 Tagen bei 22° C.
d) Einwirkung von frischem Material auf sterile Milch.

a) Kleieprobe F, frisch.

Probe F erwies sich sowohl quantitativ als qualitativ als eine der keimreichsten Kleien. Verarbeitung und Untersuchung wie üblich.

Flora pro Gramm Material:

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Bacterium fluorescens	1,2 Millionen	=	8 %
Bacterium putidum	0,8 „	=	5 %
Bacterium punctatum	1,0 „	=	7 %
Gelber Gasbildner	3,5 „	=	24 %
Gelber Säurebildner	3,2 „	=	21 %
Bacterium herbicola aureum	2,0 „	=	13 %
Cf. Bacterium levans	1,0 „	=	7 %
Unbekannt 2	1,2 „	=	8 %
Unbekannte Kokken	0,6 „	=	4 %
Bacillus anthracis	0,4 „	=	3 %
	14,9 Millionen	=	100 %

b) Kleie F, angefeuchtet 12 Stunden bei 22° C.

Nach 12-stündiger Gärungszeit war die Probe makroskopisch noch unverändert; jedoch machte sich ein schwacher Anklang an säuerlichen Geruch bemerkbar. Die Flora zeigte folgende Zusammensetzung pro Gramm trockene Kleie:

Bacterium fluorescens	30 Millionen	=	2 %
Bacterium herbicola aureum	80 „	=	4 %
Bacterium acidi lactici	70 „	=	3 %
Gelber Gasbildner	1210 „	=	57 %
Gelber Säurebildner	200 „	=	10 %
Unbekannt 1	500 „	=	24 %
	2090 Millionen	=	100 %

Das frische Material weist die maximale Keimzahl aller untersuchten Kleieproben auf. Wie die Zusammenstellung zeigt, fanden sich pro Gramm 14,9 Millionen Bakterien, trotzdem die Probe makroskopisch ganz normal, also keineswegs zu beanstanden war.

In bezug auf die Arten ist eine große Reichhaltigkeit zu verzeichnen. Es ließen sich zehn verschiedene Spezies nachweisen, was bis dahin noch bei keiner Probe der Fall war. Auffallend ist hier die große Zahl der Peptonisierenden: Bacterium fluorescens, gelber Gasbildner, gelber Säurebildner, Bacterium punctatum, B. levans, die zusammen nicht weniger als 67 Proz. der Gesamtflora ausmachen. Ganz besondere Bedeutung ist in dieser Kleieprobe dem Vorkommen einer milzbrandähnlichen Art beizumessen. Morphologisch konnte kein Unterschied zwischen dieser isolierten Art und dem echten Milzbrandbazillus herausgefunden werden. Trotzdem dieser gefürchtete Schädling bloß in einer Menge von 3 Proz. der Gesamtzahl vertreten ist, so sind doch pro Gramm des Futtermittels 400 000 Keime vorhanden, eine Menge, die gewiß sehr bedenklich erscheinen muß. (Daß es sich hier um den typischen **Bacillus anthracis** Kohn u. Koch handelte, ergab sich aus den wiederholten Versuchen von Prof. Dr. Silberschmidt.)

Das angefeuchtete Material weist nach 12 Stunden einen Bakteriengehalt von 2090 Millionen pro Gramm auf; es ist also eine 140-fache Zunahme zu verzeichnen. 34 Proz. der ursprünglichen Flora sind verschwunden, so daß also die 2090 Millionen Keime aus 9,9 Millionen hervorgegangen sind; hier darf die Vermehrung als relativ langsam bezeichnet werden.

Der Artenbestand zeigt ein stark verändertes Bild. Von den zehn Spezies des frischen Materials sind bloß noch vier vorhanden, sechs sind nicht mehr nachweisbar. Neu sind dagegen Unbekannt 1 und Bact. acidi lactici in einer Zahl von 500 bzw. 70 Millionen pro Gramm aufgetreten. Die weitaus vorherrschende Art ist nun der gelbe Gasbildner, der 57 Proz. der gesamten Keimzahl beansprucht. Er hat sich am raschesten von allen vorhandenen Arten vermehrt (346-fach!). Bacterium fluorescens, offenbar durch die Säurebildner beeinträchtigt, brachte es von 1,2 auf 30 Millionen, ging aber dennoch relativ von 8 auf 2 Proz. zurück. Ein ähnliches Verhalten zeigt der gelbe Säurebildner, der einen relativen Rückgang von 21 auf 10 Proz. aufweist. Auch Bacterium herbicola aureum vermehrte sich ums 40-fache, ging aber prozentual von 13 auf 4 zurück. Somit hat einzig der gelbe Gasbildner unter den schon in der frischen Kleie nachweisbaren Bakterienarten eine absolute und relative Zunahme aufzuweisen.

c) Kleie F, angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C.

Am 13. November 1909 wurde die Gärung eingeleitet; am 15. November erfolgte die Untersuchung der Probe. Makroskopischer Befund: Kleie stark gebräunt, Geruch etwas stechend muffig-faulig. Die angelegten Kulturen ergaben folgenden Florenbestand pro Gramm trockene Kleie:

Bacterium fluorescens	10 000	Millionen	=	7 %
Bacterium acidi lactici	12 000	„	=	8 %
Gelber Gasbildner	86 000	„	=	59 %
Gelber Säurebildner	10 000	„	=	7 %
Unbekannt 1	28 000	„	=	19 %
	146 000	Millionen	=	100 %

Vorstehende Probe weist einen Bakteriengehalt von 146 Milliarden pro Gramm auf. Die Zunahme gegenüber dem frischen Material beträgt demnach das 9800-fache. Gegenüber der 12 Stunden alten Kleie ergibt sich eine Vermehrungszahl von rund 70.

Die Artenzahl ist stark reduziert worden. Von den im frischen Krüsch nachgewiesenen zehn Spezies sind nur noch drei vertreten. Mit großer Wucht hat sich der gelbe Gasbildner in dem am Anfang eingeschlagenen Tempo vermehrt und behauptet sich nun mit 86 Milliarden als Leitbakterium. An diese Art reiht sich der im frischen Material noch nicht nachweisbare Unbekannt 1 an. Im 12 Stunden alten Krüsch ist die letztgenannte Art bereits aufgetreten und hat nun bis zum Ende des zweiten Tages eine 56-fache Vermehrung erfahren. Eine bedeutende absolute Zunahme weisen auch Bact. acidi lactici und B. fluorescens auf. Ganz verschwunden ist Bacterium herbicola aureum, das noch im 12 Stunden alten Krüsch 4 Proz. der Keime ausmachte. Dieser Umstand bestätigt aufs neue die früher gemachte Erfahrung, daß die genannte Bakterie sich in gärender Kleie am Anfang noch bedeutend vermehrt, nach 1—2 Tagen aber total unterdrückt wird.

d) Sterile Milch, geimpft mit Kleie F, frisch.

Herstellung der Probe, Impfung und Untersuchung wie üblich. Die Bakterienflora zeigte folgende Zusammensetzung:

	pro ccm	Milch		
Bacterium fluorescens	16	Millionen	=	4 %
Bacterium putidum	3	„	=	1 %
Bacterium punctatum	4	„	=	1 %
Bacterium levans	6	„	=	2 %
Unbekannt 1	10	„	=	3 %
Bacterium acidi lactici	16	„	=	4 %
Gelber Säurebildner	22	„	=	6 %
Gelber Gasbildner.	105	„	=	29 %
Bacterium Güntheri	180	„	=	50 %
	362	Millionen	=	100 %

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

In die sterile Milch wurden in 100 ccm 0,149 Millionen Keime eingeimpft, also pro Kubikzentimeter rund 1500. Die bei Zimmertemperatur aufgestellte Milch wurde nach 24 Stunden makroskopisch und mikroskopisch untersucht. Die makroskopisch wahrnehmbare Veränderung war kaum auffallend. Zwischen Rahm und Milch zeigten sich nur eine Anzahl größere und kleinere Gasblasen. Die Serumzone fehlte; der Geschmack war unangenehm ranzig, kaum merklich sauer.

Nach 24 Stunden betrug der Keimgehalt 362 Millionen, also ca. das 240 000-fache der eingeimpften Keime. Die im Impfmaterial vorhandenen Arten finden sich teilweise in anderen Zahlenverhältnissen auch in der geimpften Milch wieder. Jedoch wurden vier Arten oder 28 Proz. der Bakterienzahl des Impfmaterials gänzlich unterdrückt, nämlich: Bacterium herbicola aureum, alle Kokken, Bacillus anthracis und Unbekannt 2. Dagegen sind zwei neue Arten hervorgetreten: Unbekannt 1 und, in einer Menge von vollen 50 Proz. des Gesamtbestandes, das Bacterium Güntheri. Die relativ günstigen Vermehrungsbedingungen erklären diese explosionsartige Entwicklung.

Zusammenstellung der Hauptuntersuchungsergebnisse von Probe E und F.

	Probe frisch	Probe 12 Std. bei 22° C	Probe 48 Std. bei 22° C	Sterile Milch + frisches Material
Probe E				
Gesamtzahl der Bakterien in Mill. pro g	11,4	61	83 000	20,7
Davon sind in %				
Bacterium fluorescens	2	5	6	—
Coli-aërogenes-Gruppe	2	—	6	18
Gelber Gasbildner	22	62	2	—
Gelber Säurebildner	—	—	4	80
Unbekannt 1	—	17	30	—
Probe F				
Gesamtzahl der Bakterien in Mill. pro g	14,9	2090	146 000	362
Davon sind in %				
Bacterium fluorescens	8	2	7	4
Coli-aërogenes-Gruppe	—	3	8	4
Gelber Gasbildner	24	57	59	29
Gelber Säurebildner	21	10	7	6
Unbekannt 1	—	24	19	3
Bacterium Güntheri	—	—	—	50
Bacillus anthracis	3	—	—	—

Auch in diesen beiden Proben zeigt sich eine gewisse Parallele, indem die Bakterienzahl im gärenden Material sehr rasch ansteigt, in der geimpften Milchprobe selbst aber eine relativ bescheidene ist. Die beiden frischen Kleieproben zeigen allerdings wenig Übereinstimmung in den vorkommenden Arten. Doch ändert sich das Verhältnis, genau wie bei Probe C und D, während der Dauer der Gärung zugunsten einer mehr auch qualitativen Übereinstimmung der Flora. Die 48 Stunden in Gärung belassenen Kleieproben weisen denn auch nicht weniger als fünf gemeinsame Arten auf, die bei Probe E zusammen 48 Proz., bei Probe F sogar 100 Proz. ausmachen.

8. Untersuchung von neun weiteren Kleieproben in frischem Zustande.

Kleie G, grobe Kleie. Diese Probe ist gleicher Herkunft wie Probe F, nur ist G ein grobflockiges Material. Aussehen der Probe normal, Geruch aromatisch. Am 12. November 1909 wurden die üblichen Nährböden beschickt und die Kulturen am 25. November untersucht. Wir lassen, wie bei den vorhergehenden Proben, auch hier die Angabe der Keimzahlen auf den einzelnen Nährböden der Kürze halber weg und geben in einer Zusammenfassung nur die Maximalzahlen der auf den einzelnen Nährböden entwickelten Arten kund. Probe G zeigte folgende Flora:

	pro g Kleie		
Bacterium fluorescens	300 000	=	6 %
Bacterium putidum	200 000	=	4 %
Bacterium vulgare	200 000	=	4 %
Bacterium herbicola aureum	600 000	=	13 %
Bacterium acidi lactici	200 000	=	4 %
Gelber Gasbildner	2 000 000	=	42 %
Gelber Säurebildner	1 200 000	=	25 %
Unbekannter Coccus	100 000	=	2 %
	4 800 000	=	100 %

Kleie H, grobe Kleie, bezogen durch gefällige Vermittlung von Herrn Prof. D. von Zug. Aussehen sehr schön, frisch; Geruch normal aromatisch. Verarbeitung am 26. November 1909. Bakteriologischer Befund:

	Keimgehalt pro g		
Bacillus mesentericus	3 000	=	3 %
Bacterium fluorescens	6 000	=	7 %
Bacillus megatherium	5 000	=	5 %
Bacillus tumescens	4 000	=	5 %
Bacterium herbicola aureum	20 000	=	22 %
Gelber Säurebildner	42 000	=	46 %
Unbekannte Kokken	2 000	=	2 %
Bacterium acidi lactici	3 000	=	3 %
Bacterium Güntheri	2 000	=	2 %
Bacillus anthracis	5 000	=	5 %
	92 000	=	100 %

Kleie I, feine Kleie. Herkunft wie Kleie H. Eingang der Probe am 17. November 1909, Verarbeitung am 19. November. Aussehen normal, frisch, ganz feinflockig, griesmehlähnlich. Bakterienflora pro Gramm:

Bacterium fluorescens	80 000	=	11 %
Bacillus mesentericus	40 000	=	5 %
Bacillus megatherium	40 000	=	5 %
Bacillus tumescens	60 000	=	8 %
Bacterium acidi lactici	50 000	=	7 %
Gelber Gasbildner	100 000	=	14 %
Gelber Säurebildner	50 000	=	7 %
Bacterium vulgare	320 000	=	43 %
	740 000	=	100 %

Kleie K, grobe Kleie. Eingang der Probe am 23. November 1909 von Littau (Kt. Luzern); Verarbeitung am 25. November, Material normal, ziemlich grobflockig. Keimgehalt pro Gramm:

Bacterium fluorescens	600 000	=	9 %
Bacillus mesentericus	200 000	=	3 %
Bacillus megatherium	100 000	=	1 %
Bacterium acidi lactici	600 000	=	9 %
Gelber Gasbildner	3 000 000	=	45 %
Gelber Säurebildner	2 200 000	=	33 %
	6 700 000	=	100 %

Kleie L, feine Kleie. Herkunft und Eingang der Probe wie K, Aussehen normal, doch hie und da sind kleinere, lockere Ballen zu beobachten, voraussichtlich herrührend von vorübergehend feuchter Aufbewahrung des Futtermittels. Die Probe ist hellfarben, von Mehlresten durchsetzt und ganz fein gemahlen. Sie wies folgende Bakterienflora auf:

	pro g Material		
Bacterium fluorescens	220 000	=	6 %
Bacillus megatherium	20 000	=	1 %
Gelber Gasbildner	1 000 000	=	28 %
Gelber Säurebildner	600 000	=	17 %
Bacillus anthracis	100 000	=	3 %
Weiße Streptothrix	600 000	=	16 %
Unbekannt 6	1 040 000	=	29 %
	3 580 000	=	100 %

Kleie M, grobe Kleie. Dieses Untersuchungsmaterial wurde durch gefällige Vermittlung von Herrn Dr. K., von Liebefeld, Bern, bezogen und am 17. November nach der üblichen Methode untersucht. Das makroskopische Aussehen der Probe war sehr gut, diese selbst stark grobflockig und von frischem aromatischem Geruch. — Versuchsergebnisse: Es wurden pro Gramm gefunden:

Bacterium fluorescens	120 000	=	15 %
Bacterium herbicola aureum	430 000	=	54 %
Gelber Gasbildner	90 000	=	11 %
Gelber Säurebildner	130 000	=	16 %
Bacterium acidi lactici	30 000	=	4 %
	800 000	=	100 %

Kleie N, feine Kleie. Herkunft wie Probe M. Eingang am 15. November 1909, Verarbeitung am 17. November. Aussehen der Probe normal, mittlere Flockengröße. Flora pro Gramm Kleie:

Bacterium fluorescens	800 000	=	8 %
Bacterium putidum	200 000	=	2 %
Bacterium herbicola aureum	2 600 000	=	25 %
Gelber Gasbildner	3 200 000	=	30 %
Gelber Säurebildner	3 200 000	=	30 %
Bacterium acidi lactici	500 000	=	5 %
	10 500 000	=	100 %

Kleie O, grobe Kleie. Diese Probe wurde durch Herrn B. von Hasle (Kt. Luzern) bezogen. Eingang des Materials am 18. November 1909, verarbeitet am 19. November. Makroskopisches Aussehen der Probe normal, Geruch aromatisch. Die Untersuchung ergab folgendes Resultat:

	Keimgehalt pro g		
Bacterium fluorescens	120 000	=	8 %
Gelber Säurebildner	360 000	=	25 %
Gelber Gasbildner	240 000	=	15 %
Bacterium herbicola aureum	60 000	=	4 %
Unbekannte Kokken	720 000	=	48 %
	1 500 000	=	100 %

Kleie P, feine Kleie (Marke „Griesmehl“). Bezugsquelle wie bei Probe O. Das Material ist ein ganz fein gemahlenes, mit Mehlresten stark durchsetztes, helles Krüsch. Aussehen normal.

Versuchsresultate: Nachgewiesener Keimgehalt pro g.

Bacillus mycoides	200 000	=	10 %
Gelber Gasbildner	220 000	=	11 %
Gelber Säurebildner	700 000	=	37 %
Bacterium herbicola aureum	230 000	=	11 %
Bacterium acidi lactici	400 000	=	21 %
Unbekannte Kokken	200 000	=	10 %
	1 950 000	=	100 %

Zusammenfassung.

Die wichtigsten Spaltpilzarten der Kleieproben G bis P sind:

Probe	Gesamtzahl pro g	Prozentuelle Vertretung einzelner Arten							
		Bact. fluorescens	Bacillus megatherium	Bact. acidi lactici	Bact. herb. aureum	Gelber Gasbildner	Gelber Säurebildner	Kokken	Rest
G	4 800 000	6	—	4	13	42	25	2	8
H	92 000	7	5	3	22	—	46	2	15
I	740 000	11	5	7	—	14	7	—	56
K	6 700 000	9	1	9	—	45	33	—	3
L	3 580 000	6	1	—	—	28	17	—	48
M	800 000	15	—	4	54	11	16	—	—
N	10 500 000	8	—	5	25	30	30	—	2
O	1 500 000	8	—	—	4	15	25	48	—
P	1 950 000	—	—	21	11	11	37	10	10

Der Keimgehalt der einzelnen Proben ist, wie man aus der ersten Zahlenkolonne entnehmen kann, sehr stark variierend. Von den neun Proben zeigte das Krüsch H mit 92 000 Keimen pro Gramm den weitaus niedrigsten Gehalt an Bakterien, während die Kleie N 10 500 000 Mikroorganismen enthielt. Im letzteren Falle ließen sich also 114-mal mehr Bakterien nachweisen. Der durchschnittliche Gehalt aller neun Proben beträgt 3 407 000 Mikroorganismen pro Gramm, also eine verhältnismäßig recht hohe Zahl.

Woher nun aber diese großen Schwankungen in der Keimzahl? Es sind wohl sehr verschiedenartige Faktoren, die hier von Einfluß sein können. Wie Hiltner und später auch Lominsky (93) und andere Forscher nachwiesen, sind gesunde Pflanzenteile im Innern keimfrei, oder doch nicht reich an Bakterien. Der Bakteriengehalt des Pflanzeninnern kommt also als Faktor für die Beeinflussung der Kleie nicht oder kaum in Betracht.

Es müssen also die Keime vorwiegend äußerlich anhaften und die Quantität dieser anhaftenden Keime steht nun wohl auch mit den Witterungsverhältnissen in gewisser Beziehung. Während eines nassen Sommers z. B. wird sich nicht nur die Zahl der im allgemeinen epiphytisch auf den vegetativen und reproduktiven Teilen der Getreidepflanze lebenden Spaltpilze infolge der für sie nun eingetretenen günstigeren Lebensbedingungen enorm steigern, sondern zu den harmlosen Epiphyten werden sich auch bald eigentliche Schmarotzer gesellen. Durch länger andauernde Feuchtigkeit, besonders auf nassem Boden, werden immer einige, namentlich jüngere, aus zarterem Gewebe bestehende Pflanzenteile, ebenso ältere, losgetrennte Pflanzenreste, oder auch Düngerbestandteile, in Gärung und Fäulnis übergehen, und das werden die Infektionsherde bilden, von denen aus auf mechanischem Wege auch gesunde Pflanzenteile mit Bakterien besiedelt werden. Somit ist es leicht erklärlich, daß sich in unseren Untersuchungen neben der spezifisch epiphytischen Grasflora, wie sie von Burri (18) und Düggeli (35) eingehend untersucht wurde, auch viele, mehr zufällige Bakterienspezies nachweisen ließen. Endlich bietet sich zahlreiche Gelegenheit zu weiterer Verunreinigung beim Lagern, Verladen und Transport des Getreides. So gesellen sich zu den ursprünglich an der Oberfläche des Getreidekornes vorhandenen Spezies noch weitere Arten, die, wie jene, an der Außenseite haften bleiben und den weiten Weg vom Infektionsplatz bis zur Mühle mitmachen. Da aber, wie bereits gesagt, die überwiegende Menge der Spaltpilze äußerlich den Spelzen und der Fruchtschale anhaftet, so kommt beim Mahlprozeß der größte Teil derselben in die Kleie. Schließlich wird auch die Art der Aufbewahrung der Kleie selbst von bestimmendem Einfluß auf deren Bakteriengehalt sein. Aus den verschiedenartigsten Infektionsmöglichkeiten und Vermehrungsbedingungen lassen sich daher die großen Schwankungen im Keimgehalt der einzelnen Kleieproben unschwer erklären.

Von den 15 im ganzen vorkommenden Arten in vorstehenden neun Proben ist nur eine einzige überall vertreten, nämlich der gelbe Säurebildner Levy. Diese Art scheint also ein sehr häufiger Bewohner der Kleie zu sein. Doch zeigen sich auch bei dieser Spezies große absolute und relative Schwankungen in der Zahl der vorkommenden Individuen. Diese Zahl beträgt im Durchschnitt 942 400, im Minimum 42 000, im Maximum jedoch 3 200 000, also das 76-fache. Prozentuell bewegen sich die Zahlen zwischen 46 und 7. — Eine fast ebenso häufige Art wie der gelbe Säurebildner ist Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N., das nur ausnahmsweise nicht nachweisbar ist. In unseren Proben schwankt der Gehalt pro Gramm zwischen 800 000 und 6000, also ums 133-fache; in Prozent aber nur zwischen 15 und 6.

Noch häufiger als Bacterium fluorescens ist der gelbe Gasbildner Holliger. Wir fanden als Maximum der Keimmenge pro Gramm 3 200 000, als Mittel 1 094 400 und als Minimum 90 000. Dieser Organismus ließ sich im frischen Kleiematerial ebenfalls nur ein einzigesmal nicht nachweisen, trat aber auch in diesem Falle, wie Fluorescens, in dem gärenden Material der betreffenden Probe stets deutlich hervor, ein Beweis also, daß die Art auch im frischen Krüsch vorhanden sein mußte.

Die drei genannten Spezies können also als ständige, charakteristische Arten in der Bakterienflora der untersuchten Kleieproben bezeichnet werden. Daraus wird man aber auch schließen dürfen, daß sie sich ursprünglich schon auf dem Getreidekorn, wenigstens in bescheidener Anzahl, vorfinden werden.

Als nächstfolgender häufigster Vertreter reiht sich das Bacterium acidi lactici an. Es kommt in sieben von neun untersuchten Fällen vor und zeigt sowohl absolut als auch relativ ebenfalls ganz bedeutende Schwankungen. Die Zahlen bewegen sich zwischen 600 000 und 3000 bzw. 21 und 3 Proz. Weil diese Bakterie sozusagen Kosmopolit ist, muß nicht notwendig angenommen werden, daß sie unbedingt zu der Ursprungsflora der Getreidepflanze gehöre, sondern viel wahrscheinlicher ist, daß sie sich erst im Verlaufe der Ernte, des Transportes, der Lagerung oder Verarbeitung des Getreides einfand, oder sich auch später während der Aufbewahrung der Kleie ansiedelte.

Etwas weniger regelmäßig, wenn auch noch in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle, ließ sich das schon des öfteren erwähnte Bacterium

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

herbicola aureum nachweisen. In den untersuchten neun Proben kam es sechsmal vor. Als mehr oder weniger beständiger und in größerer Menge vorkommender Bewohner der Getreidepflanze ist es ohne Zweifel auch in der Kleie regelmäßig vorhanden; jedoch scheint uns, daß nicht selten die Großzahl der Individuen nach und nach die Vermehrungsfähigkeit auf künstlichen Nährböden einbüßt. Daher wird man diese Art in Kleie, die z. B. von älterem Getreide stammt, öfters vermissen. Die genannte Art kann in Kleie auch in großer Menge vorkommen, es sei daran erinnert, daß sie in einer früheren Probe mit 8 Millionen Keimen pro Gramm in einem Falle 74 Proz. der Gesamtflora ausmachte.

In vier von neun Fällen ließen sich auch Kokken nachweisen; meist aber in geringerer Zahl. Nur einmal schien eine eigentliche Kokkenflora vorzuherrschen, in Kleie O, wo diese Organismen 48 Proz. der Keime umfaßten.

Von den gewöhnlichen Erdbakterien Bacillus mesentericus und Bacillus megatherium fand sich der letztere in vier, der erstere in drei der untersuchten neun Proben vor. Noch seltener waren Bact. putidum (Flügge) L. et N., Bacillus tumescens, Bacterium vulgare (Hauser) L. et N. und Bacillus anthracis. Alle fanden sich in je zwei der geprüften neun Proben. — Nur ganz zufällig stellten sich auch Bacillus mycoides Flügge und Bacterium Güntheri ein; ebenso eine weiße Streptothrix, Unbekannt 5 und ein nicht identifizierbares Stäbchen.

9. Zusammenfassung der wichtigsten Resultate aus der Kleieuntersuchung.

I. Frische Kleie.

1. Keimgehalt: a) Die in normaler, frischer Kleie mittels der am besten geeigneten Nährböden nachgewiesene Bakterienzahl ist eine unerwartet große. Sie beträgt im Mittel der 15 untersuchten Proben rund 5 976 000 pro Gramm.

b) Feine Kleie ist im allgemeinen bedeutend reicher an Spaltpilzen als grobe Kleie. Bei letzterer beträgt der Durchschnitt von acht Proben 4 709 000 Keime, bei feinem Krüsch dagegen im Mittel von sieben Proben 7 424 000 Spaltpilze pro Gramm. Der Mehrgehalt an Bakterien in feiner Kleie beläuft sich demnach in unseren Versuchen auf 57,6 Proz.

2. Arten: In frischer Kleie ist eine recht bedeutende Anzahl von Arten nachweisbar. Im ganzen wurden 23 solcher isoliert, von denen 18 identifiziert werden konnten. Quantitativ sehr stark verbreitet ist Bact. herbicola aureum (Burri et Düggeli). Diese Art beansprucht im Durchschnitt aller untersuchten Proben 23,5 Proz. der Gesamtkeimzahl. Doch war Bacterium herbicola aureum in drei Proben nicht nachzuweisen. Sehr häufig, wenn auch im allgemeinen quantitativ etwas zurücktretend, kommen der gelbe Gasbildner Holliger und der gelbe Säurebildner Levy in frischer Kleie vor. Die erstere Art macht im großen Durchschnitt 20, die letztere 17 Proz. der Keimzahl der untersuchten Kleieproben aus. Eines der regelmäßigsten Kleiebakterien, trotzdem aber prozentuell ziemlich zurücktretend, ist das Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N. Diese Art weist eine durchschnittliche Frequenz von 9 Proz. der Gesamtflora auf. Dann folgen in ungefähr gleichem Stärkeverhältnis Bacillus mesentericus Flügge und die Coli-aërogenes-Gruppe. Bac. megatherium (De Bary), Bacillus tumescens Zopf und Bacterium Güntheri L. et N. kommen mehr nur gelegentlich vor.

Von ganz besonderer Wichtigkeit ist das Auftreten von Bacillus anthracis Cohn und Koch in Kleie. Der Milzbranderreger konnte von uns in drei Kleieproben nachgewiesen werden, nämlich in Probe F mit 400 000, in Probe H mit 5000 und in Kleie L mit 100 000 Keimen pro Gramm.

Da der echte Milzbrandbazillus bis dahin in den Futtermitteln höchst selten nachgewiesen werden konnte, trotzdem aber durch diesen Krankheitserreger alljährlich Schäden verursacht werden, die in die Millionen steigen, so scheint es uns angezeigt, auf die bezüglichen bisherigen Forschungsresultate, soweit wir davon in der uns zugänglichen Literatur Einsicht nehmen konnten, ganz kurz zusammenfassend, etwas näher einzutreten.

Der Milzbrand ist die erste Seuche, bei welcher Bakterien als Erreger mit Bestimmtheit nachgewiesen werden konnten. Nach Hutyra und Marek[1]) sollen schon 1836 von Eilert Impfversuche mit milzbrandhaltigem Material mit positivem Erfolge vorgenommen worden sein. Theodor Kitt[2]) und J. Bongert[3]) geben an, daß der Milzbranderreger selbst zuerst von Pollender (1849) in Milzbrandkadavern entdeckt worden sei. Später hat sich eine ganze Reihe, zum Teil berühmter Forscher mit dieser wichtigen Infektionskrankheit beschäftigt, so Brauell, Rayer, Devaine, Delafoud, Pasteur, R. Koch und andere, so daß wir heute über Wesen und Verlauf der Krankheit ziemlich gut orientiert sind.

Der Milzbrand ist bekanntlich eine sehr akut auftretende und sehr weit verbreitete Krankheit. Er kommt fast in der ganzen Verbreitungszone des Rindes vor. Doch gibt es innerhalb dieses großen Gebietes bestimmte Gegenden oder eng begrenzte Territorien, sogenannte Milzbranddistrikte, wo die Krankheit sozusagen stationär ist. Diese Erscheinung steht in engem Zusammenhang mit der Art der Verbreitung und Entwicklung des Bacillus anthracis. — Die erste Ursache ist in der Regel in einer zu wenig sorgfältigen Beseitigung von Milzbrandkadavern zu suchen. Die äußerst resistenten Sporen entwickeln sich nämlich nur bei genügendem Sauerstoffzutritt und daher regelmäßig außerhalb des Tierkörpers oder an dessen Oberfläche. Besonders gefährliche Infektionsquellen sind nach Oppenheim[4]) die blutigen Fäces und das aus dem Körper austretende Blut gefallener Tiere, da diese Stoffe als Nährmedien für die Sporulation, die sich außerhalb des Tierkörpers rasch vollzieht, sehr günstig sind. Auf diese Weise entstehen die lokalen Infektionsherde, große Ansammlungen von Sporenmaterial, die unter Umständen Jahrzehnte lang als Verbreitungszentren für die Krankheit dienen können. Von solchen Infektionsherden aus können die Pilze auch auf das Futter gelangen. Nach Hutyra und Marek (l. c.) können nun „die in das Futter geratenen Bazillen sich bei genügender Feuchtigkeit und entsprechend hoher Temperatur weiter vermehren, Sporen erzeugen und auf diese Weise zu Stallinfektion Veranlassung geben“.

Als fernere Infektionsquelle können die Häute der an Milzbrand zugrunde gegangenen Tiere dienen. Silberschmidt[4]) hat festgestellt, daß manche Gerbereien, die überseeische Tierhäute verarbeiten, als Infektionsherd für Milzbrand angesprochen werden müssen, da durch die Abwässer das Sporenmaterial in die Flüsse und von diesen durch Bewässerung oder

---

[1]) Hutyra u. Marek, Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere. Bd. 1. Jena 1910.

[2]) Kitt, Th., Bakterienkunde und bakteriologische Mikroskopie. Wien 1908.

[3]) Bongert, J., Bakteriologische Diagnostik mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre, der Seradiagnostik und der Schutzimpfung. Leipzig 1908.

[4]) Hutyra u. Marek (l. c.).

Überschwemmung in Wiesen und Felder gelangen kann, wodurch das Futter infiziert wird. Frank[1]) berichtet über einen Fall in der Provinz Posen, wo auf dem Lehmbelag des über einem Stall sich befindenden Futterbodens mehrere an Milzbrand verendete Schafe ausgehäutet wurden. In den vereinzelten, auf den Boden gefallenen Bluttröpfchen entwickelten sich Sporen, welche sich beim Abbröckeln des Lehmbelages mit dem darauf liegenden Futter vermischten und so mehrere Jahre hindurch als unentdeckter Infektionsherd großen Schaden anrichteten.

In den Kraftfuttermitteln wurde der echte Milzbrandbacillus bisher äußerst selten nachgewiesen. Meistens wurden nur milzbrandähnliche Organismen gefunden. So wies Burri (zit. in 87) einen anthracisähnlichen Sporenbildner in amerikanischem Fleichfuttermehl nach; der Entdecker bezeichnete den Pilz als pseudanthracis. Hüppe (nach 87) isolierte einen Bacillus anthracoides, der im makroskopischen Bild dem Bacillus anthracis ebenfalls täuschend ähnlich war, mikroskopisch aber sich mehr dem Bacillus subtilis näherte. Dagegen fand A. Jäger[2]) sowohl vegetative Formen als auch Sporen vom Milzbrandbazillus in einem aus Rumänien importierten Hafer. Dies ist einer der ganz vereinzelten Fälle, in denen echte Milzbranderreger in Futtermitteln nachgewiesen werden konnten. In Kleie hat man den Bacillus anthracis unseres Wissens noch nie entdeckt. — Als wir daher bei der Untersuchung der Kleieproben F, H und L auf einen sowohl in Gelatinestich, als auch auf Gelatine- und Agarplattenkulturen typisch milzbrandähnlich wachsenden Organismus stießen, dachten wir vorerst, es handle sich um Bacillus pseudanthracis Burri. In Anbetracht ihrer Wichtigkeit verfolgten wir jedoch die Sache weiter. Aus jeder der drei Kleieproben F, H und L wurde ein Stamm des fraglichen Organismus in Reinkultur herangezüchtet. Dann wurde der Pilz zu starker Sporulation gebracht und nun das sporenhaltige Material an Seidenfäden eingetrocknet. Das waren unsere Stammkulturen. Diese Kulturen wurden nun auf verschiedenen Nährböden auf ihre Artzugehörigkeit genau geprüft. Ein Vergleich mit den bezüglichen Angaben in der Literatur führte uns immer mehr zur Überzeugung, daß die Spezies Bacillus anthracis vorliegen mußte. — Ein älterer Laboratoriumsstamm von anthracis, den uns Herr Prof. Dr. E. Zschokke in Zürich zur Verfügung zu stellen die Freundlichkeit hatte, zeigte vollständige Übereinstimmung mit den von uns isolierten Stämmen. Schließlich ergab ein Vergleich der kulturellen Merkmale dieser Stämme mit einem frisch isolierten virulenten Stamm, der ebenfalls von Herrn Prof. Zschokke bezogen wurde, nur ganz geringfügige Unterschiede.

Alle diese Vorversuche sprachen deutlich dafür, daß es sich doch um den echten Milzbrandbazillus handeln mußte. Es erfolgte daher noch die Prüfung auf Pathogenität, die Herr Prof. Dr. Silberschmidt, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Zürich, in zuvorkommender Weise übernahm. Die Versuche wurden mit Mäusen vorgenommen und ergaben überall positiven Erfolg. Die erste Maus starb gleich am Tage nach der Impfung, die zweite in der darauf folgenden Nacht. Bei der Sektion der Versuchstiere wurde als Todesursache typischer Milzbrand festgestellt.

Das Vorkommen des Bacillus anthracis in der Kleie ist praktisch von großer Wichtigkeit. Mit dieser Entdeckung dürfte eine weitere

---

[1]) **Hutyra u. Marek** (l. c.).

[2]) **Kitt, Th.**, l. c.

Grundlage geschaffen sein, um manche bis dahin noch ganz unaufgeklärte Fälle von sporadischem Auftreten der Milzbrandseuche erklären zu helfen. — Wenn irgendwo auf einem Getreidefeld Milzbrandkadaver zu wenig vorsichtig vergraben wurden, oder wenn die Düngung zufällig durch Exkremente milzbrandkranker Tiere, oder durch sporenhaltiges Knochenmehl stattfand, oder wenn vielleicht auch Abwässer von Gerbereien, wo man Häute von an Milzbrand eingegangenen Tieren verarbeitete, zur Bewässerung verwendet wurden, so ist eine Infektion sowohl der grünen Getreidepflanzen als auch der Getreidefrucht zwanglos zu erklären. Die Sporen von Bacillus anthracis werden an den Körnern haften bleiben und gelangen in die Mühle. Die Mühle selbst, beziehungsweise alle Teile derselben, die mit solchem Getreide in Berührung kommen, werden infiziert und können somit als Verbreitungszentrum für die Krankheit dienen. Die meisten Sporen werden wohl auf den Kleiebestandteilen sitzen bleiben, und es ist sehr leicht denkbar, daß durch Verfütterung solcher Kleie an landwirtschaftliche Nutztiere ganz unvermittelt Fälle von sporadischem Milzbrand auftreten können. Durch die in unseren Versuchen festgestellte Tatsache, daß der Milzbrandbacillus in virulenter, infektionsfähiger Form in der Kleie vorkommen kann, dürfte somit zur näheren Erforschung solcher Fälle der Weg gewiesen sein.

II. Gärende Kleie.

1. Keimgehalt: a) Bei 22° C findet in angefeuchteter Kleie eine, nach ca. 8—12 Stunden sehr energisch einsetzende Keimzahlzunahme statt. Diese hat meist mit dem dritten bis vierten Tag ihren Höhepunkt erreicht und geht von da an wieder langsam zurück. Im Durchschnitt aller bezüglichen Versuche war eine Vermehrung der ursprünglichen Keimzahl eingetreten nach

12	Stunden	ums	81	-fache
24	„	„	5 388	„
48	„	„	12 980	„
3	Tagen	„	21 400	„
5	„	„	14 140	„

b) Bei 37° C setzt die Kleiegärung ebenso energisch ein; die Bakterienzahl pro Gewichtseinheit aber geht in der Regel schon vom zweiten Tage an ganz bedeutend zurück.

2. Arten: a) Im ersten Stadium der Gärung sind die Abweichungen im Artenbestand zwischen frischer und gärender Kleie nicht sehr groß. Immerhin gelangen nur ganz ausnahmsweise alle im frischen Material vorhandenen Arten zur Vermehrung.

b) Mit fortschreitender Gärung unterliegt die Flora auch qualitativ mehr und mehr einer Veränderung und zwar immer im Sinne einer Überhandnahme von Gas- und Säurebildnern.

c) Der Gärungsvorgang in angefeuchteter Kleie muß als ein metabiotischer Prozeß bezeichnet werden.

III. Einwirkung frischer Kleie auf Milch.

1. Konsummilch. Die bei unseren Versuchen innegehaltene Impfmenge von $^1/_{100}$ g Kleie auf 100 ccm Milch vermochte im großen ganzen keine wesentliche Einwirkung auf den Verlauf des in der Konsummilch sich ohne Impfung abspielenden Gärungsvorganges bei 37°, 22° und 12° auszuüben. Die Ursprungsflora der frischen Milch und vor allem die Aufbewahrungstemperatur

verursachen einen viel entscheidenderen Einfluß auf die Entwicklungsrichtung der Bakterienflora der Milch, als die mit der kleinen Impfmenge eingebrachten Spaltpilze.

2. Sterilisierte Milch. Das Nährmedium, die Milch, beeinflußt die Entwicklung der einzelnen mit der frischen Kleie eingesäten Spaltpilzarten bei 22° sehr stark. Der Fall ist nicht selten, wo Arten, die in frischer Kleie so spärlich vorhanden waren, daß ein Nachweis mittels der verwendeten Nährböden und der sich sonst bewährenden Verdünnungsmethode nicht möglich erschien, mittels Milch deutlich nachweisbar, ja sogar mehrfach dominierend wurden.

IV. Einwirkung gärender Kleie auf Milch.

1. Milch bei 22° C aufbewahrt: a) In frischer, reinlich gewonnener Milch vermag gärende Kleie in einer Menge von $^1/_{100}$ g auf 100 ccm Milch einen bedeutenden Einfluß auf die Bakterienflora auszuüben, und zwar stets im Sinne einer Verminderung der Haltbarkeit der Milch, was hauptsächlich durch die Zufuhr von Gas- und Säurebildnern bedingt wird.

b) In unreinlich gewonnener, also schon bakterienreicher und daher nicht haltbarer, oder in einer bereits mit Bacterium Güntheri L. et N. angereicherten Milch (gewöhnliche Marktmilch), vermag die Wirkung einer Impfmenge von $^1/_{100}$ g gärender Kleie auf 100 ccm Milch auf den Bakterienbestand sowohl quantitativ als qualitativ nicht deutlich hervorzutreten.

c) In allen Fällen erlangen die Milchsäurebakterien mit der Zeit in den Milchproben mehr oder weniger entschieden die Oberhand.

d) Gärende Kleie bewirkt in steriler Milch in der Regel eine entscheidende Überwucherung der Coli-aërogenes-Gruppe. Bacterium Güntheri L. et N. vermag hier, wenn auch im Impfmaterial vorhanden, nicht so gut aufzukommen wie in gewöhnlicher Konsummilch.

2. Milch bei 37° C aufbewahrt: a) Die Einwirkung des eingeimpften Materials ist in der Regel deutlicher als bei 22° C. Sie macht sich fast in allen Fällen schon makroskopisch durch eine frühzeitigere Veränderung der Milch geltend.

b) Durch die Impfung findet regelmäßig eine gänzliche Überwucherung der Flora durch die gasbildenden Milchsäurebakterien statt.

3. Milch bei 12° C aufbewahrt: a) In der Flora treten die Fluoreszenten bedeutend hervor; die Milch wird regelmäßig bitter.

b) Bacterium Güntheri L. et N. ist auch hier am stärksten vertreten. Doch kommen nicht selten auch Gasbildner vor.

V. Bemerkungen über einzelne Arten.

1. Weder Bacterium vulgare (Hauser) L. et N. noch Bacillus putrificus Bienstock, noch Bacillus anthracis Cohn et Koch vermögen in stark angesäuerter, bei 22° C aufbewahrter Milch sich zu entwickeln.

2. Das Bacterium aërogenes Escherich aus Kleie kann in fortgesetzter Kultur auf künstlichen Nährböden das Schleimbildungsvermögen verlieren und ist dann von einem normalen Bacterium acidi lactici Hüppe kaum mehr zu unterscheiden.

3. Die Wahrnehmung von Burri (20), daß die Gasbildung in der Coli-aërogenes-Gruppe scheinbar verschwinden, aber auch wieder spontan auftreten kann, wurde bestätigt gefunden.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

II. Erdnuß.

1. Vorbemerkungen.

Die Rückstände der Erdnußölbereitung, die als Erdnußkuchen und Erdnußmehle in den Handel kommen, bilden wegen ihres überaus hohen Proteïngehaltes, des für die frische Ware charakteristischen Wohlgeschmackes und der hervorragenden Bekömmlichkeit wohl eines der besten und gesuchtesten Kraftfuttermittel, das namentlich in der Mittel- und Ostschweiz sehr häufig Verwendung findet. Nach C. Böhmer hat lufttrockenes Erdnußmehl im Mittel folgende Zusammensetzung:

Wasser	10,17 %
Rohproteïn	47,79 %
Rohfett	7,74 %
N-freie Extraktivstoffe	24,43 %
Rohfaser	5,10 %
Asche	4,77 %
	100,00 %

Eine ganz analoge Zusammensetzung weisen die Erdnußkuchen auf. Man rechnet für gute Kuchen im Durchschnitt 45—48 Proz. Proteïnstoffe und etwa 6—8,5 Proz. Fette. Vom Gesamtstickstoff sind nach Stutzer nicht weniger als 95,5—96,4 Proz., also über $^{19}/_{20}$, verdaulich.

Die überwiegende Hauptmenge der bei uns importierten Erdnußkuchen stammt aus Afrika, besonders aus Westafrika und kommt hauptsächlich über Marseille und Hamburg zur Einfuhr. Die Herkunft, vor allem aber auch die Ernte, die Aufbewahrung und die Art der Verarbeitung der Erdnüsse hat nun den größten Einfluß auf die Qualität des von diesen stammenden Kraftfutters. In dem aus den Nüssen hergestellten zerkleinerten und zum Zwecke der Ölgewinnung zwei- bis dreimal gepreßten Material bleiben immer noch etwa 10 Proz. Öl zurück, und nur diese Masse — nicht aber das nachher noch mit Schwefelkohlenstoff, Benzin, Äther usw. vollständig entölte Preßgut — ist als zuträgliches Futtermittel verwendbar.

2. Die wichtigsten bisherigen Forschungsresultate.

Die bedeutenden Rückstände an Öl im Erdnußmehl oder Erdnußkuchen bewirken bei längerer, ungeeigneter Aufbewahrung ziemlich leicht das Ranzigwerden. Daher kann der Grad der Ranzidität oft einen bestimmten Anhaltspunkt zur Beurteilung der Frische des Materials bieten. In dieser Beziehung sind schon zahlreiche und zum Teil recht eingehende Untersuchungen gemacht worden. Reitmayr (109) stellte folgende Hauptergebnisse fest: Das Arachisfett ist sehr leicht veränderlich; frisch enthält es keine freien Fettsäuren; die Verseifungszahl ist minimal, die Jodzahl aber maximal. Abgepreßtes Erdnußöl verändert sich langsam und nur unwesentlich. Die schnellste Veränderung tritt bei starker Lichteinwirkung auf; die Jodzahl sinkt, die Verseifungszahl dagegen steigt in diesem Falle. Von den Erdnußfuttermitteln verändern sich am schnellsten die fettarmen Kuchen. Die hohe Jodzahl des Fettes derselben ist das beste Kennzeichen für deren Frische. Nach Ristert[1]) stehen die Mikroorganismen zum Ranzigwerden der Fette in den Futtermitteln in keiner ursächlichen Beziehung. In ranzigen Fetten kommen zwar Schimmelpilze, Oidien und Hefen vor, aber in frischen unzersetzten Fetten sterben die absichtlich zugesetzten Keime der verschiedenen

---

[1]) Chem. Centralbl. 1890. Bd. 2

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

anaëroben und aëroben Arten ab, was um so rascher geschieht, je mehr das Sonnenlicht einwirkt. Auch van Pesch, G. Loges und C. Claessen, Dyer, Gilbard, Heinrich und andere haben sich mehr oder weniger eingehend mit der chemischen Veränderung der Kraftfutterfette befaßt; aber diese Ermittlungen beschränkten sich eben meist nur auf die chemische Natur der Futtermittel. Doch hat man sehr häufig die Erfahrung gemacht, und auch in allerneuester Zeit bei uns wieder, daß landwirtschaftliche Nutztiere die Aufnahme von Erdnußkuchen und Erdnußmehlen strikte verweigerten, trotzdem das Futtermittel makroskopisch ganz normal aussah und auch chemisch sich nichts Verdächtiges finden ließ. Dammann, Behrens und Oppermann berichten in der Deutschen landwirtschaftlichen Presse (Jahrgang 1906. p. 270), daß Kühe, Schweine und Schafe, nachdem sie nur zwei- bis dreimal Erdnußfutter zu sich genommen hatten, jede weitere Annahme verweigerten. Nach eingehenden Untersuchungen mit dem betreffenden Material kamen die Verff. zu der Ansicht, daß manche Erdnußrückstände bestimmte Stoffe enthalten müßten, die im Magen der Tiere Anlaß zu Merkaptanbildung geben und beim Rülpsen in der Mundhöhle einen so widerlichen Geschmack verursachen, daß die Tiere jede weitere Annahme des betreffenden Futtermittels entschieden verweigern. J. Widen (133) findet als Ursache der Verweigerung die Bildung von Trimetylamin, was voraussichtlich auf die Wirkung von Bakterien zurückzuführen wäre. So vermag z. B. das Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N., das ein häufiger Bewohner von Erdnußmehl und -kuchen ist, Trimetylamin in bedeutenden Quantitäten zu bilden. — Gefährlicher noch als die bloße Verweigerung von Erdnuß sind jene zahlreichen Fälle, wo die Futtermittel infolge fortgeschrittener Zersetzung, besonders durch Zersetzung von Eiweißstoffen direkt Giftsubstanzen enthalten, die den tierischen Organismus schädigen, oder auch in die Milch übergehen. So berichtet schon B. Martiny in der Deutschen landwirtschaftlichen Presse 1890. p. 380, daß Milch von Kühen, die mit etwas verdächtigem Erdnußkuchen gefüttert wurden, bei Kindern Vergiftungserscheinungen hervorrief. In der gleichen Zeitschrift (107) wurden später noch weit schlimmere Erfahrungen bekannt gegeben. Es heißt dort wörtlich: „Infolge der Riesenverluste, die den deutschen Landwirten, besonders den schleswig-holsteinischen, durch Verfütterung von Erdnußmehl in ihrem Rindviehstand erwachsen sind, wurden in den bakteriologischen Instituten zu Kiel Fütterungsversuche damit angestellt. Die Versuchstiere sind sämtlich gestorben.“ Schütt beobachtete laut Zeitschrift für Gestütenkunde (1907. p. 93), daß von zehn Fohlen, die eine kleine Beigabe von schimmeligem Erdnußmehl erhielten, drei eingingen, und Bugge gibt in der Illustrierten landwirtschaftlichen Zeitung (1908) an, daß die Verfütterung von Erdnußrückständen bei Kühen heftige Magen- und Darmentzündung, angeschwollene Milz und Leber, innere Blutungen usw. hervorrief. Die Ursache dieser Erscheinungen ist nach seiner Ansicht ebenfalls im Vorkommen von Zersetzungsprodukten der Eiweißstoffe zu suchen. Solche gesundheitsschädliche Kuchen enthalten immer relativ viel Amidstickstoff, sind von mehr brauner Farbe, zeigen einen hohen Grad der Ranzigkeit und enthalten besonders viel Schimmelpilze und Bakterien. Auch Uhlitzsch (128) gibt an, daß die Schädlichkeit von Erdnußkuchen durch Mikroorganismen bedingt werde. Von diesen und anderen Forschern wurde also schon lange die Vermutung ausgesprochen, daß Kleinlebewesen als Ursache der beobachteten Giftwirkung zu betrachten seien. Es sind denn auch schon Versuche gemacht worden, nicht nur bloß die Chemie, sondern auch die Bakteriologie bei Aufklärung dieser Vergiftungserscheinungen zu Rate zu ziehen. Dammann, Behrens und Oppermann (31) impften Bouillon direkt mit Erdnußmehl und injizierten das Filtrat subkutan verschiedenen Kaninchen ein, aber die Versuchstiere blieben gesund. — Die Verff. bewahrten auch verschiedene Proben von Erdnußmehlen in feuchter Kammer auf und gaben als Hauptflora Mucor- und Aspergillus-Arten an. Hiltner fand in Erdnußkuchen, der von den Tieren widerwillig verzehrt wurde, pro Gramm 167 000 Schimmel und ca. 1 Million Bakterien. Gonnermann (49) isolierte aus Erdnußkuchen, „der in chemischer Hinsicht nicht zu beanstanden war, bei der Fütterung an das Vieh aber äußerst schädlich wirkte“, einen Sproßpilz und zehn verschiedene, vom Verf. allerdings nicht näher beschriebene Bakterienarten. Sehr eingehende Untersuchungen haben König, Spieckermann und Olig (84) gemacht. Sie stellten vorerst fest, daß sich die Bakterienflora in allen Proben faulenden Baumwollsaatmehles physiologisch gleich verhalte. Bei gänzlichem Luftabschluß entwickelten sich nur zuckervergärende Stäbchen, Gasbildner und Kokkenarten. Obligat Aërobe fanden die Verff. selten. Bei mangelhaftem Luftzutritt traten ebenfalls Zuckervergärer in den Vordergrund. Zu diesen gesellten sich dann noch sehr widerstandsfähige, sporenbildende Bazillenarten, die immer weiter in die Masse eindrangen, je mehr sie die, durch die Zuckerverzehrer gebildete Säure durch das von ihnen erzeugte Ammoniak zu neutralisieren vermochten. Cohn und Eidam (zit. sub 47) beschäftigten sich mit der Untersuchung von Erdnuß auf Mikroorganismen. Sie isolierten einen gelben und einen schwarzen Aspergillus, mehrere Mucorarten, und außerdem wird bemerkt, daß in vielen Kuchen und Mehlen enorme Mengen von Kokken und Bakterien auftraten. Holdefleiß[1]) kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu folgenden Schlüssen: Erdnußmehl enthält viele Sporen von nicht einheimischen Pilzarten. Diese müssen also aus dem Produktionsland der Erdnüsse stammen. Das Vorhandensein vieler Sporen, sowie ganzer Sporangien von Schimmelpilzen deutet auf frühere gute Ernährungsbedingungen für Kleinlebewesen hin. Man muß annehmen, daß die Bakterien Zersetzungen hervorrufen, denn das Verhältnis des Bakteriengehaltes im Kraftfutter ist fast immer umgekehrt proportional der Menge des Eiweißgehaltes. Bei Vorhandensein gesundheitsschädlicher Substanzen sind stets auch große Mengen von Bakterien nachweisbar. Über das Vorkommen bestimmter Arten macht Verf. keine näheren Angaben. Dagegen hat Emmerling (zit. 47) eine Einteilung der von ihm aus Erdnußmehl isolierten Bakterienarten skizziert. Er fand: Kugelige Zellen, auch in Form von Zoogloën; ferner Mikrokokken, Stäbchen, Fadenpilze (Leptothrix und Cladothrix), selten wurden Sarcinen und Spirillen gefunden. Von 52 untersuchten Erdnußproben fand Verf. nur 32 = 61 Proz. pilzhaltig. Starke Schimmelbildung zeigte sich bei 19 Proben. Im allgemeinen kam Verf. zum Ergebnis, daß die Mehle öfter pilzhaltig seien als die Kuchen (Verhältnis 69 : 55). Es gelang ihm auch zu beweisen, daß Erdnußfuttermittel, die einen etwas höheren Proteïngehalt aufweisen, viel seltener Pilzsporen enthalten als solche mit niedrigerem Proteïngehalt. Im allgemeinen sind also proteïnreiche Erdnußkuchen und -mehle pilzärmer als eiweißärmere Produkte. Dieses Verhältnis zwischen Keimgehalt und Proteïngehalt scheint insofern erklärlich, als die natürliche Zersetzung von

---

[1]) Literaturverzeichnis Nr. 47.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Eiweißstoffen überhaupt und daher auch die Abnahme dieser Stoffe im Erdnußmehl die Tätigkeit von Mikroorganismen voraussetzt, wobei, wie bekannt, regelmäßig eine Anzahl basischer, N-haltiger Körper als Produkte des Mikrobenstoffwechsels, Fäulnisprodukte, Ptomaïne oder Leichengifte entstehen, die dann, obwohl im Futtermittel vielleicht auch nur in geringer Menge vorhanden, die erwähnten, nicht selten beobachteten Giftwirkungen im tierischen Körper bedingen können. — Auf Grund seiner Wahrnehmungen beurteilt Emmerling die Frische und Qualität des Erdnußmehles nach dessen Pilzgehalt. Pilzfreie Produkte — deren es aber nach unseren Beobachtungen sehr wenige geben dürfte — sind nach ihm Prima-Qualität; schwach pilzhaltige zählt er zur II. Qualität, und stark infizierte Kuchen und Mehle sollte man überhaupt niemals verfüttern. Hiltner (zit. 47) jedoch weist unter guter Begründung darauf hin, daß ein solcher allgemeiner Schluß unzulässig sei. Auch er untersuchte Kraftfuttermittel, vielfach aber angefeuchtete und äußert sich, daß es regelmäßig nur wenige Bakterienarten sind, die sich bei der Digestion der Futtermittel entwickeln, ein Ergebnis, das auch wir im Verlaufe unserer Untersuchungen immer wieder bestätigt fanden. Hiltner fand in Erdnuß- und Palmkernkuchen eine besonders charakteristische Form, die sich durch Bildung von Zoogloën auszeichnete und regelmäßig zu finden war. Dieser Spaltpilz verursachte keine unangenehmen Gerüche. Höchstwahrscheinlich hatte Verf. es hier mit dem später von Düggeli beschriebenen Bacterium herbicola aureum zu tun. Als Begleiter dieser Zoogloënform werden angegeben ein Clostridium, Bacillus subtilis u. a. Hiltner ist der Ansicht, daß im Erdnußmehl durch die „Doppelzoogloënform“ die Zersetzung eingeleitet und durch die Heu- und Buttersäurebazillen dann fortgesetzt werde. Im Gegensatz zu Emmerling betont Verf., daß es nicht angehe, die Frische der Proben nach dem Gehalte an Schimmelpilzen oder Bakterien zu beurteilen, weil die Grundfrage, ob die Bakterien die Ursache oder bloß eine Folgeerscheinung der Zersetzungen seien, eben noch nicht sicher gelöst sei. „Man weiß nicht, ob und welche Formen für die einzelnen Futtermitttel typisch sind, kennt vor allem noch nicht die Wirkungsweise dieser Formen auf den gesamten Organismus des Tieres und dessen einzelne Teile“.

Von manchen Forschern, wie z. B. von B. Schulze (115) und Neubauer (96) wurde auch der Ermittlung des Sandgehaltes, sowie der mechanischen Verunreinigung der Futtermittel überhaupt, besondere Aufmerksamkeit zugewendet. Wir wollen hier auf die bezüglichen Untersuchungsergebnisse nicht näher eintreten.

Es wäre noch eine ganze Reihe von weiteren Autoren anzuführen, die sich mehr oder weniger mit der Untersuchung von Erdnußmehl und Erdnußkuchen beschäftigt haben, so z. B. Brown, Theodor, Ristert, Ramm, Momsen, Schumacher usf. Aber die Resultate der bakteriologischen Forschung sind, trotzdem die Futtermittel so oft Gegenstand der Untersuchung waren, verhältnismäßig recht spärlich, da in der Regel das Hauptgewicht auf die Entdeckung von Fälschungen und Verunreinigungen, oder aber auf chemische Untersuchungen gelegt wurde.

3. Untersuchungsmethode.

Hiltner (68) hat schon im Jahre 1891 eine Methode zur Qualitätsbestimmung von Futtermitteln auf bakteriologischem Wege vorgeschlagen, nämlich das Gelatineplattenverfahren. Dieses soll nach ihm „vollkommenen Aufschluß geben, ob und welche Zersetzungen das betreffende Mehl bereits vor der Untersuchung erlitten habe, und die Bestimmung sämtlicher im Futtermittel vorhandenen Keime nach Art und Zahl gestatten“. Heute dürfte dieser Satz allerdings nicht mehr unterschrieben werden. Die Methode der Verarbeitung war nach Hiltner folgende: ¼ g des zu prüfenden Futtermittels wurde mittels eines kleinen Platinspatels in flüssiger Gelatine verteilt oder, falls Verdünnungen vorgenommen werden mußten, zunächst in sterilem Wasser in bestimmter Menge in einem verschließbaren Glaskölbchen aufgeschwemmt. Dann wurde die inzwischen flüssig gemachte Gelatine in die Petrischale gegossen und nun eine bestimmte Menge von der Aufschwemmung zugesetzt. Die so hergestellten Platten wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, und nach 2—3 Tagen waren die sich entwickelnden Kolonien sichtbar. Verf. betont, daß es sich weniger um die absolute Menge der im Futtermittel vorhandenen Spaltpilze bei einer Beurteilung dieser Futtermittel handeln dürfe, als um die Kenntnis der betreffenden Arten. Eine praktische Prüfung besonders auf Frische und Verfälschung führt Verf. unter Benutzung von Jod durch. Reine, frische Kuchen färben sich wegen der vorhandenen Stärke mit Jod blau. Wenn Verfälschungen oder Verunreinigungen, wie z. B. mit Mohn, Palmkern, Reisschalen vorkommen, so tritt eine gelbliche Färbung auf.

König, Spieckermann und Olig (84) untersuchten gärendes Baumwollsaatmehl auf Bakterien. Sie setzten dem zu untersuchenden Material 50 Proz. steriles Wasser zu und prüften nun von Woche zu Woche auf den Bakteriengehalt. Die gefundenen Organismen wurden, ohne Bestimmung der einzelnen Arten, in 6 Gruppen oder Typen getrennt. Diese traten alle in den ersten 2 Wochen der Gärung auf. Besonders häufig fand sich eine Bakterie vom Typus Bacterium coli commune (Escherich) L. et N. Nach dem Zurücktreten dieser Gruppe setzten mehrere proteïnzersetzende Arten ein. Verff. weisen darauf hin, daß in angefeuchtetem Erdnußmehl, bzw. Baumwollsaatmehl als erste Phase der Veränderung unter allen Umständen die Vergärung des Zuckers zu Säuren und Gasen stattfinde. Diese Säureentwicklung hindere das Aufkommen von Proteïnzersetzern. Erst in späteren Stadien und bei Luftzutritt treten dann Eiweißzersetzer auf, welche jeweilen unter Mitwirkung von Schimmelpilzen, durch das entstehende Ammoniak, die Säure binden.

Dammann, Behrens und Oppermann untersuchten die verdächtigen Erdnußkuchen und -mehle wie folgt: 500 g des betreffenden Futters wurden in feuchter Kammer bei 37° C aufbewahrt. Vom zweiten Tage an zeigten sich Mucor- und Aspergillus-Arten. Bei direkter Impfung von Erdnußmehl in Nährbouillon entwickelte sich bei 37° C innerhalb 24 Stunden reichlich Gas. Die Gasentwicklung ging jedoch schon nach 48 Stunden zurück und verschwand schließlich ganz. Wie wir später sehen werden, tritt diese Erscheinung bei angefeuchteten Futtermitteln, die bei 37° C gären, ganz regelmäßig ein.

Was nun die von uns angewendete Untersuchungsmethode für Erdnuß betrifft, so schließt sich diese im allgemeinen jener, bei Untersuchung der Kleie angewendeten, enge an. Es wird diesbezüglich daher auf die Angaben im allgemeinen Teil verwiesen. Eine Abänderung bei der Untersuchung von Erdnuß fand insofern statt, als auch die Einwirkung des frischen und gärenden Materials auf sterile Milch systematisch und analog wie mit Konsummilch durchgeführt wurde. Im ganzen gelangten 11 Proben von Erdnußmehl und 7 Proben von Kuchen verschiedenster Herkunft zur Untersuchung. Von den ersteren wurden 2 Proben ganz ausführlich behandelt, 2 folgende Untersuchungsreihen wurden, meistens zum Zwecke einer verläßlichen Kontrolle der bei den Hauptversuchen gefundenen Resultate, noch in den wichtigsten Punkten durchgeführt, 2 weitere Proben untersuchten wir nur noch in frischem und gärendem Zustande; beim Rest der Proben endlich wurde nur das frische Material auf den Bakteriengehalt geprüft. Von den 7 Proben der Erdnußkuchen wurden 2 in frischem und gärendem, 5 nur in frischem Zustande untersucht.

Erdnußmehle.

4. Eingehende Untersuchung von Erdnußmehlprobe A.

Diese Probe ging am 1. Dezember 1909 durch gütige Vermittlung von Herrn Dr. K. von einer bernischen landwirtschaftlichen Genossenschaft ein. Das makroskopische Aussehen des Mehles war tadellos, die Farbe ziemlich hell; das Material erschien als Ia Ware. — Zur Orientierung über Umfang und Verlauf des Versuches schicken wir hier voraus eine

Übersicht der Verarbeitung.

A. Untersuchung des Materials selbst.

	Kurze Bezeichnung der Proben
α) Erdnußprobe A frisch.	
β) Material angefeuchtet, gärend:	
Serie 1 a Bei 37° C während 24 Stunden	I a
b „ 37° C „ 48 „	I b
c „ 37° C „ 4 Tagen	I c
Serie 2 a „ 22° C „ 24 Stunden	II a
b „ 22° C „ 48 „	II b
c „ 22° C „ 4 Tagen	II c

B. Wirkung von Erdnußmehl A frisch und in verschiedenen Gärstadien auf Konsummilch.

α) Untersuchung der frischen Konsummilch selbst	C M
Serie 3 Kontrollmilchproben	
a Kontrollmilch bei 37° C aufbewahrt	K a
b „ „ 22° C „	K b
c „ „ 12° C „	K c
β) Die mit frischem oder gärendem Material geimpften Milchproben:	
Serie 4 Frische Konsummilch, geimpft mit frischem Erdnußmehl A	
a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M I
b „ „ „ 22° C „	M II
c „ „ „ 12° C „	M III
Serie 5 Frische Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl I a (24 Std. bei 37°)	
a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M I a
b „ „ „ 22° C „	M I b
c „ „ „ 12° C „	M I c
Serie 6 Frische Konsummilch, geimpft mit Probe I b (48 Std. bei 37°)	
a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M II a
b „ „ „ 22° C „	M II b
c „ „ „ 12° C „	M II c
Serie 7 Frische Konsummilch, geimpft mit Probe I c (4 Tage bei 37°)	
a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M III a
b „ „ „ 22° C „	M III b
c „ „ „ 12° C „	M III c

		Kurze Bezeichnung der Proben
Serie 8	Frische Konsummilch, geimpft mit Probe II a (24 Std. bei 22°)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M IV a
	b „ „ „ 22° C „	M IV b
	c „ „ „ 12° C „	M IV c
Serie 9	Frische Konsummilch, geimpft mit Probe II b (48 Std. bei 22°)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M V a
	b „ „ „ 22° C „	M V b
	c „ „ „ 12° C „	M V c
Serie 10	Frische Konsummilch, geimpft mit Probe II c (4 Tage bei 22°)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	M VI a
	b „ „ „ 22° C „	M VI b
	c „ „ „ 12° C „	M VI c

C. Wirkung von Erdnußmehl A frisch und in verschiedenen Gärstadien auf sterile Milch.

Serie 11	Sterile Milch, geimpft mit frischem Erdnußmehl A.	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S I
	b „ „ „ 22° C „	S II
	c „ „ „ 12° C „	S III
Serie 12	Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl I a (24 Std. bei 37°)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S I a
	b „ „ „ 22° C „	S I b
	c „ „ „ 12° C „	S I c
Serie 13	Sterile Milch, geimpft mit Probe I b (48 Std. bei 37°)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S II a
	b „ „ „ 22° C „	S II b
	c „ „ „ 12° C „	S II c
Serie 14	Sterile Milch, geimpft mit Probe I c (4 Tage bei 37° C)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S III a
	b „ „ „ 22° C „	S III b
	c „ „ „ 12° C „	S III c
Serie 15	Sterile Milch, geimpft mit Probe II a (24 Std. bei 22° C)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S IV a
	b „ „ „ 22° C „	S IV b
	c „ „ „ 12° C „	S IV c
Serie 16	Sterile Milch, geimpft mit Probe II b (48 Std. bei 22° C)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S V a
	b „ „ „ 22° C „	S V b
	c „ „ „ 12° C „	S V c
Serie 17	Sterile Milch, geimpft mit Probe II c (4 Tage bei 22° C)	
	a Geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt	S VI a
	b „ „ „ 22° C „	S VI b
	c „ „ „ 12° C „	S VI c

D. Zusammenfassung der Ergebnisse.

A. Untersuchung des Materials selbst.

a) Erdnußmehl A frisch.

Am 3. Januar 1910 wurden 2 g des zu untersuchenden Mehles steril abgewogen und auf die übliche Weise auf folgende Nährböden verarbeitet:

Gelatineplatten: Gewöhnliche Gelatine, Molkengelatine und Peptonschottengelatine.

Agarplatten: Gewöhnliche Agar-, Milchzuckeragar-, Traubenzuckeragar- und Peptonschottenagarplatten.

Kulturen in hoher Schicht: Milchzuckeragar, Traubenzuckeragar und Peptonschottenagar. Am 11. Januar wurden auf den einzelnen Nährböden folgende Keimzahlen pro Gramm festgestellt:

Gelatine:	Gewöhnliche Gelatineplatten	**450 000** Keime,
	Molkengelatineplatten	270 000 „
	Peptonschottengelatineplatten	320 000 „
Agar:	Gewöhnliche Agarplatten	350 000 „
	Milchzuckeragarplatten	**460 000** „
	Traubenzuckeragarplatten	400 000 „
	Peptonschottenagarplatten	390 000 „
Hohe Schicht:	Milchzuckeragar h. Sch.	kaum 2000 Keime,
	Traubenzuckeragar h. Sch.	keine neuen Arten, ca. 1800 Bakt.
	Peptonschottenagar h. Sch.	„ „ „ „ 1800 „

Wie aus diesen Zahlen ersichtlich ist, hängt es wesentlich von der Zusammensetzung des Nährbodens ab, ob eine größere Zahl der im Untersuchungsmaterial vorhandenen Keime überhaupt zum Wachstum gelangt oder nicht. Molkengelatine, Peptonschottengelatine und Nähragar scheinen speziell der Flora des frischen Erdnußmehles nicht sehr gut zuzusagen. Auch Traubenzuckeragar und Peptonschottenagar stehen dem Milchzuckeragar bedeutend nach.

Selbstredend wählten wir nun im folgenden für die Untersuchung des frischen Erdnußmehles jene Nährböden aus, die in obiger Zusammenstellung bei genau gleicher Herstellung und Behandlung der Kulturen die maximalen Keimzahlen aufwiesen, nämlich für Plattenkulturen gewöhnliche Gelatine und Milchzuckeragar, für die hohe Schicht Milchzuckeragar. Dies schien um so mehr gerechtfertigt, als weitere in dieser Richtung durchgeführte Prüfungen übereinstimmende Resultate ergaben.

Die qualitative Zusammensetzung der Flora des frischen Erdnußmehles ist auf den genannten Nährböden folgende:

	Keimzahlen	pro g
Bacterium fluorescens	10 000 =	2 %
Bacillus tumescens	10 000 =	2 %
Bacillus mesentericus	64 000 =	11 %
Bacillus subtilis	96 000 =	16 %
Unbekannt 10	120 000 =	20 %
Bacterium putidum	10 000 =	2 %
Bacterium aërogenes	40 000 =	6 %
Bacterium acidi lactici	20 000 =	3 %
Gelber Gasbildner	20 000 =	3 %
Gelber Säurebildner	10 000 =	2 %
Nicht verflüssigender Coccus, groß	10 000 =	2 %
Nicht verflüssigender Coccus, klein	10 000 =	2 %
Langsam verflüssigender Coccus in gelbl. Kolonien	10 000 =	2 %
Langsam verflüssigender Coccus, orange, klein	10 000 =	2 %
Langsam verflüssigender Coccus, orange, groß	10 000 =	2 %
Gelbe Sarcina	20 000 =	3 %
Streptothrix, braune Kolonien	10 000 =	2 %
Streptothrix, weiße Kolonien	10 000 =	2 %
Rötliche Hefe	20 000 =	3 %
Gelbliche Kolonien mit beweglichen, schlanken Kurzstäbchen	20 000 =	3 %
Weiße Kolonien mit unbeweglichen Kurzstäbchen	10 000 =	2 %
Langsam verflüssigende Kurzstäbchen	20 000 =	3 %
Kolonien mit plumpen, gelblichen, wurstfg. Gebilden	20 000 =	3 %
Kurzstäbchen mit gekrümmten Formen	10 000 =	2 %
Bacillus putrificus coli	2 000 =	—
	592 000 =	100 %

Nicht weniger als 25 verschiedene Arten ließen sich in dieser Erdnußmehlprobe nachweisen. Alle, mit Ausnahme von Bacillus putrificus, sind mit einer Zahl von mindestens 10 000 Keimen pro Gramm vertreten. Den ersten Platz nimmt quantitativ Unbekannt 10 ein, ein ganz schlankes, sporenloses, nicht verflüssigendes, unbewegliches Langstäbchen, das wahrscheinlich als exotische Art mit den Erdnüssen vom Produktionsland eingeführt wurde und eine in der Literatur noch nicht beschriebene Art darzustellen scheint. Wohl die wichtigsten bekannten Organismen sind Bacillus mesentericus und B. subtilis, die auch Hiltner in Erdnußmehl häufig fand. Diese beiden Vertreter der Kartoffel- und Heubazillen nahmen zusammen 27 Proz. der gesamten Keimzahl ein. Sie zeigten auf den Agarplatten eine üppige Entwicklung, während sie auf Gelatineplatten nur kümmerlich wuchsen.

Ein wesentlicher Teil der Bakterienflora konnte nicht genau identifiziert werden. Vor allem auffallend ist die reiche Vertretung der Arten aus der Gruppe der Kokken, da nicht weniger als 6 verschiedene Typen isoliert werden konnten. Die Kokken verhalten sich aber im allgemeinen so latent, daß sich die Artbestimmung sehr umständlich und schwierig gestaltet, weshalb wir von einer weiteren Verfolgung dieser Organismen absahen, besonders auch in Hinsicht darauf, daß ihre Wirksamkeit weder im Erdnußmehl noch in der Milch eine tiefgreifende sein wird. — Bemerkenswert ist besonders das Vorkommen von Bacillus putrificus coli, der zwar nur in verhältnismäßig geringer Zahl nachweisbar war, jedoch darauf hinweist, daß das Erdnußmehl schon früher einmal in ein gewisses Stadium der Eiweißzersetzung übergegangen sein muß. Es ist daher leicht möglich, ja sogar sehr wahrscheinlich, daß in der Probe bestimmte, für die Tiere schädliche Zersetzungsprodukte von Eiweißstoffen — wenn in unserem Falle vielleicht auch nur in geringerer Menge — vorhanden sein können.

β) Erdnußmehl A in gärendem Zustande.

Serie 1.

Erdnußmehl, angefeuchtet bei 37° C aufbewahrt.

Probe I a, 24 Stunden bei 37° C.

Am 4. Januar 1910 wurden 40 g des Materials mit 80 ccm sterilem Wasser zu einem dicken Brei angerührt. Das Mehl ließ sich sehr leicht und gleichmäßig mit dem Wasser mischen, was nach Hiltner ein Zeichen für gute Ware sein soll. Am 5. Januar fand die Verarbeitung in der im allgemeinen Teil angegebenen, üblichen Weise statt.

Makroskopisches Aussehen: Die Masse war oben ganz deutlich rötlich-violett verfärbt und es machten sich deutliche Anzeichen der Gasbildung bemerkbar. Das Material sah am Glasrande wie stark löcheriges Schwarzbrot aus und war im Volumen um ca. ⅓ vergrößert. Der Geruch erwies sich als schwach säuerlich, nicht muffig.

Um zu erfahren, auf welchen Nährböden sich die Organismen im gärenden Erdnußmehl am besten entwickeln, wurden auch bei dieser Probe wieder — wie beim frischen Material — 3 verschiedene Gelatine- und 4 Agarnährböden beschickt. Ebenso wurden die Kulturen in hoher Schicht dreifach angelegt. Die Untersuchung ergab folgende absolute Zahlen (pro Gramm lufttrockenes Erdnußmehl berechnet):

Gelatineplatten:

Gewöhnliche Gelatineplatten	6	Millionen
Molkengelatineplatten	900	„
Peptonschottengelatineplatten	800	„

Agarplatten.		
Gewöhnliche Agarplatten	35	Millionen
Milchzuckeragarplatten	12 900	„
Traubenzuckeragarplatten	6 500	„
Peptonschottenagarplatten	13 100	„
Hohe Schicht:		
Milchzuckeragar hohe Schicht . . .	294 000	„
Traubenzuckeragar hohe Schicht . .	159 000	„
Peptonschottenagar hohe Schicht .	226 000	„

Für gärendes Material, speziell für das Wachstum von Bacterium Güntheri L. et N., eignen sich also nach vorstehender Untersuchung, deren Ergebnis durch spätere Prüfungen bestätigt wurde, am besten: Molkengelatineplatten, Peptonschotten- oder Milchzuckeragarplatten und Milchzuckeragar hohe Schicht.

Die Flora in qualitativer Hinsicht zeigte folgende Zusammensetzung:

Bacterium acidi lactici	2	Millionen	= — %
Bacterium Güntheri	294 000	„	= 100 %

Das befeuchtete Erdnußmehl hat also in den ersten 24 Stunden der Gärung eine reine Milchsäuregärung durchgemacht. Bacterium Güntheri ist beinahe in „Reinkultur“ da. Die Gasbildner sind nur in schwacher Menge vertreten. Alle anderen Arten des frischen Mehles sind wie mit einem Schlage verschwunden. Der vermutliche Erreger der rötlich-violetten Färbung, ein luftliebendes, schlankes Langstäbchen, wurde durch die wuchtige Überhandnahme von Güntheri ebenfalls überwuchert.

Vergleichen wir die Flora des frischen Materials mit jener der vorstehenden Probe, so springt sofort die ungemein rasche und tiefgreifende Veränderung in die Augen, sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Richtung. Innerhalb der relativ kurzen Zeit eines Tages ist die Zahl der Keime pro Gramm von 592 000 auf 294 Milliarden angestiegen, also um rund das 500 000-fache. Aber in Wirklichkeit ist das Verhältnis ein ganz anderes; denn dem frischen und gärenden Material ist nur eine einzige Art, Bacterium acidi lactici, gemeinsam, so daß also nur 3 Proz. der Flora des frischen Erdnußmehles im gärenden Material vertreten sind. Die plötzlich auftretende neue Art, das Bacterium Güntheri, war ursprünglich höchstens in wenigen tausend Keimen pro Gramm vorhanden und die Vermehrung dieses Säurestäbchens ist also eine millionenfache.

Auf den ersten Blick erscheint es zwar etwas eigenartig, daß von den ursprünglich vorhandenen 25 Arten im frischen Erdnußmehl nach 24 Stunden nur noch eine einzige vorhanden, bzw. nachweisbar war. Der Befund ist aber nicht unerklärlich. Durch die intensive Säurebildung des mit großer Wucht sich ausbreitenden Güntheri wurde schon der allergrößte Teil der Arten im Wachstum gehindert und wenn keine bedeutende Vermehrung der übrigen Spezies stattfand, so konnte im gärenden Material, dessen Keimzahl ja ca. ½ Million mal größer ist, als die des frischen, die ursprünglich ganz bescheidene Zahl der Bakterien überhaupt gar nicht mehr zur Geltung kommen. Für einzelne Arten, namentlich für die Sporenbildner, war die Zeitspanne auch wohl etwas zu kurz, um in der Vermehrung in richtigen Fluß zu kommen, und so war es möglich, daß sich das Bacterium Güntheri, durch die gebotenen Verhältnisse begünstigt, zu so erdrückender Mehrheit aufzuschwingen vermochte.

Probe I b. Erdnußmehl A, 48 Stunden bei 37° C.

Herstellung und Verarbeitung der Probe wie bei Probe I a.

Makroskopisches Aussehen: Probe an der Oberfläche stark violett verfärbt; die Blähung des Materials ist ganz zurückgegangen; der Geruch der Probe ist intensiv sauer.

Zusammenstellung der Ergebnisse der Untersuchung.
(Keimzahl in Mill. pro g trockenes Material berechnet.)

Nährboden:	
Gewöhnliche Gelatineplatten	6
Molkengelatineplatten	140
Peptonschottengelatineplatten	99
Gewöhnliche Agarplatten	30
Peptonschottenagarplatten	3340
Traubenzuckeragarplatten	5600
Milchzuckeragarplatten	4800
Peptonschottenagar h. Sch.	5300
Milchzuckeragar h. Sch.	5600
Traubenzuckeragar h. Sch.	6300

Qualitative Zusammensetzung:				
Sproßpilz	30,0	Mill.	=	1 %
Bac. megatherium	0,1	„	=	—
Bact. acidi lactici	10,0	„	=	—
Bact. coli	1,0	„	=	—
Bact. Güntheri	6300,0	„	=	99 %
Kokken	10,0	„	=	—
Gesamtzahl:	6351,1	Mill.	=	100 %

Auch hier zeigt sich die große Überlegenheit der zuckerhaltigen Nährböden aufs augenscheinlichste. Es ist auch leicht erklärlich, wenn wir die Zusammensetzung der Flora betrachten. Das Bacterium Güntheri findet sich auch in dieser Probe in gewaltigem Übergewicht. Aber es zeigt sich schon nach 48 Stunden gegenüber dem 24 Stunden alten Mehl ein recht bedeutender quantitativer Rückgang. — Von neuen Arten sind aufgetreten ein Sproßpilz und in ganz bescheidener Menge der Bacillus megatherium. Die starke Säurebildung hat auch hier wieder unter dem bunten Artengemisch rücksichtslos aufgeräumt.

Probe I c. Erdnußmehl A, 4 Tage bei 37° C.

Makroskopisch durchlief diese Probe die Stadien der beiden vorhergehenden: In den ersten Stunden bedeutende Gasentwicklung mit schwach violettem Anflug; dann deutlich violette, später dunklere Färbung und gegen Schluß der Gärung war die Farbe tiefviolett bis dunkelbräunlich. Auch machten sich nun ein Anflug eines weißlich-grauen Schimmels und ein deutlicher Ammoniakgeruch bemerkbar. Mit Salzsäure zeigten sich weiße Dämpfe. Nach Umrühren der Masse aber wurde der Ammoniakgeruch gänzlich durch einen säuerlichen Geruch verdeckt.

Untersuchungsergebnisse:

Pro g trockene Kleie berechnet:

Bacterium fluorescens	2,0	Millionen	=	—
Gefranste Hefekolonie	14,0	„	=	1 %
Bacillus mesentericus	0,3	„	=	—
Bacillus subtilis	0,2	„	=	—
Bacterium Zopfii	3,0	„	=	—
Bacterium acidi lactici	3,0	„	=	—
Bacterium Güntheri	2400,0	„	=	99 %
Kokken	1,0	„	=	—
	2423,5	Millionen	=	100 %

Von den im frischen Material nachgewiesenen Arten sind nach 4 Tagen noch 6 vorhanden bzw. nachweisbar. Trotzdem das Bacterium Güntheri auch in der Probe Ic noch fast den ganzen Bestand ausmacht, so ist es doch seit dem ersten Tag sehr stark zurückgegangen; einige andere Arten vermögen wieder aufzutauchen. So entwickelte sich besonders auch eine nicht näher bestimmte Hefenart mit charakteristisch gefransten Kolonienrändern. Auch Bacterium fluorescens, Bacillus mesentericus und B. subtilis waren in einer zum Nachweise gerade genügenden Menge vertreten.

Serie 2.

Erdnußmehl A, angefeuchtet bei 22° C.

Die 3 Proben dieser Serie wurden in ganz gleicher Weise hergestellt und untersucht, wie die Proben der Serie 1.

Kurze Bezeichnung	Temperatur der Aufbewahrung	Gärdauer	Makroskopisches Aussehen der Probe
Probe II a	22° C	24 Std.	Schwache Gasbildung, Farbe noch unverändert, ganze Probe ziemlich unverändert.
Probe II b	22° C	48 Std.	Deutlich Gas; Oberfläche schwach violett verfärbt; Geruch etwas säuerlich-muffig.
Probe II c	22° C	4 Tage	Oberfläche violett; Schimmelanflug; derbe Flecke von Streptothrixspezies, deutlicher NH_3-Geruch.

Bei Probe II a wurden noch, wie bei Serie 1, 3 Gelatineplatten, 4 Agarplatten und 3 Kulturen in hoher Schicht von verschiedenen Nährböden angelegt. Dabei wurden die früheren Erfahrungen bestätigt. Von einer Wiedergabe aller auf den verschiedenen Nährböden gefundenen Keimzahlen sehen wir ab und lassen sofort eine Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse von der ganzen Serie 2 folgen:

Zahlen in Millionen pro g lufttrockene Substanz berechnet:

Bakterienart	Erdnußmehl II a		Erdnußmehl II b		Erdnußmehl II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	2	—	—	—
Bacillus mesentericus . . .	1	—	+	—	—	—
Bacillus subtilis	1	—	+	—	—	—
Bacterium coli	—	—	3	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	3	—	12	1	50	5
Bacterium aërogenes	4	—	3	—	120	12
Gelber Gasbildner	2	—	8	—	—	—
Gelber Säurebildner	1	—	11	1	—	—
Unbekannt 12	3	—	25	1	—	—
Bacterium Güntheri	3200	100	1900	97	800	83
Gesamtzahl:	3215	100	1964	100	970	100

Die Bakterienflora hat in der Probe II a bei 22° C eine ähnliche Entwicklung eingeschlagen, wie in Probe I a bei 37° C. Von den vor 24 Stunden nachweisbaren 25 Spaltpilzspezies sind nur noch 7 vorhanden. Neu aufgetreten ist auch hier wieder das bekannte Bacterium Güntheri, und zwar stellt es nahezu den ganzen Bestand dar, indem keine einzige der anderen Spezies auch nur annähernd eine Vertretung von 1 Proz. zu erreichen vermochte. Die diesbezügliche höchste Zahl stellt das Bacterium aërogenes; aber auch diese Art brachte es kaum auf $^1/_8$ Proz. der gesamten Keimzahl.

In Probe II b sind, außer den in der Tabelle angeführten Arten, noch in ganz untergeordneter Zahl auch Bacillus mesentericus und B. subtilis anwesend. Ferner wurde in der hohen Schicht ein unbekanntes, dickes, etwas gekrümmtes Kurzstäbchen gefunden, das aber ebenfalls von ganz unwesentlicher Bedeutung zu sein schien. Die „Leitbakterie“ ist, wie früher, auch wieder Güntheri. Doch scheint diese Art sowohl absolut, als auch relativ den Kulminationspunkt schon überschritten zu haben. Dafür gewinnen die gasbildenden Milchsäurebakterien, der gelbe Gasbildner und ein unbewegliches Kurzstäbchen, dessen gelbe Kolonien von traubiger, rosettenförmiger Struktur sind und das wir als Unbekannt 12 bezeichneten, mehr an Bedeutung.

Im Material II c, das angefeuchtet 4 Tage bei 22° C stand, ist das bis anhin dominierende Bacterium Güntheri immer noch in großer Menge vorhanden, aber die Gasbildner machen daneben doch 17 Proz. der Gesamtflora aus.

Ein Vergleich vorstehender Proben mit dem frischen Mehle zeigt uns, daß in angefeuchtetem Erdnußmehl die anfänglich qualitativ sehr vielgestaltige Mikroflora rasch reduziert wird, die Gesamtkeimzahl aber gewaltig zunimmt. Nach 24- und 48-stündigem Aufenthalt bei 22° herrscht das Bacterium Güntheri weit vor, während nach 4 Tagen neben demselben noch die gasbildenden Milchsäurebakterien sich am Aufbau der Mikroflora beteiligen.

B. Wirkung von Erdnußmehl A frisch und in verschiedenen Gärstadien auf Konsummilch.

a) Untersuchung der frischen Konsummilch selbst.

Die Milch wurde am 7. Januar 1910 abends sofort nach dem sorgfältig erfolgten Melken vom Strickhof abgeholt, in sterile Erlenmeyerkölbchen abgemessen und mit den oben besprochenen, gärenden Erdnußmehlproben I a bis II c geimpft; 3 Proben wurden ferner mit frischem Erdnußmehl beschickt, 3 weitere Milchproben als Kontrollproben verwendet und schließlich wurde die Flora der frischen Milch selbst sofort ermittelt, indem auf übliche Weise Molkengelatine- und Milchzuckeragarplatten, sowie Milchzuckeragar hohe Schichtkultur mit entsprechenden Mengen der Frischmilch beschickt wurden.

Untersuchungsergebnisse vom 17. Januar 1910:

	Keimgehalt pro ccm		
Bacterium fluorescens	3 000	=	6 %
Bacterium acidi lactici	7 000	=	14 %
Bacterium aërogenes	3 000	=	6 %
Farbloser Sproßpilz	17 000	=	35 %
Rosahefe	4 000	=	8 %
Bacterium Güntheri	2 000	=	4 %
Diplokokken	8 000	=	17 %
Streptokokken	5 000	=	10 %
	49 000	=	100 %

Diese Milch weist einen relativ niedrigen Gehalt an Kokken auf, nur 27 Proz. der Gesamtkeimzahl. Dagegen sind die Gasbildner in verhältnismäßig bedeutender Zahl vertreten. Auch die Milchsäurebakterien sind schon in bescheidener Zahl vorhanden. Der Gesamtgehalt der Milch an Bakterien muß aber als ein relativ niederer bezeichnet werden.

Auffallend ist die sehr reiche Vertretung der Sproßpilze; sie beanspruchen nicht weniger als 43 Proz. der Keimzahl. Nach neueren Untersuchungen von Dombrowsky1) sind die Hefen in Milch und Milchprodukten sehr stark verbreitet. Genannter Autor sagt: „Neben den Bakterien sind auch die Hefen als stete Bewohner der Milch und Milchprodukte anzusehen.“ Nach unseren Erfahrungen verschwinden aber die Hefen mit fortschreitender Säuerung der Milch ganz regelmäßig in relativ kurzer Zeit.

Serie 3.

Die Kontrollmilchproben.

Die Gewinnung der Proben erfolgte dadurch, daß von der oben untersuchten Frischmilch 100 ccm in ein steriles Erlenmeyerkölbchen abgemessen und sofort mit sterilem Wattepfropf verschlossen wurde. Von den drei auf diese Weise hergestellten Proben kam je eine zu 37°, 22° und 12° C.

Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Kurze Bezeichnung	Ka	Kb	Kc
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	35 Stunden	3 Tage
Makroskopisches Aussehen .	gallertig geronnen	gallertig geronnen	feinflock. geronn.
Geschmack	normal sauer	stark sauer	säuerlich-bitter
Säuregrad	13,0 n/10 NaOH2)	16,5 n/10 NaOH	15,6 n/10 NaOH

Gesamtbakterienzahlen; Milch untersucht nach Eintreten der makroskopischen Veränderung:

Ka = 2103 Millionen pro ccm
Kb = 1520 „ „ „
Kc = 1080 „ „ „

Die einzelnen Arten waren vertreten wie folgt:

Millionen pro ccm.

Bakterienart	Ka		Kb		Kc	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	140	9	340	31
Bacterium acidi lactici . . .	3	—	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	2100	100	1380	91	740	69
Gesamtzahlen	2103	100	1520	100	1080	100

Die Kontrollmilch Ka zeigt eine reine Milchsäuregärung. Alle Nichtmilchsäurebildner, die in der frischen Milch vorhanden waren, sind verschwunden bzw. nicht mehr nachweisbar. — Dagegen ermöglichte die Temperatur von 22° C, der die Probe Kb ausgesetzt war, dem Bacterium fluorescens ein bedeutendes Wachstum. Weil die Art in frischer Milch sich schon in ziemlicher Zahl vorfand (6 Proz.), so konnte sich dieselbe bis zur stärkeren Überhandnahme des Säuregrades in der Milch zu einer ansehnlichen Zahl entwickeln. Die Flora der Kontrollprobe bei 12° C unterscheidet sich von jener bei 22° C durch die prozentual stärkere Vertretung von Bacterium fluorescens. Der niedere Wärmegrad war ohne Zweifel das bedingende

---

1) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. 1910. p. 345 ff.

2) Über die Methode der Säuregradbestimmung, siehe p. 14.

Moment, daß dieser weit verbreitete und in der Milch stets auftretende Spaltpilz zu so starker Vertretung gegenüber dem gewöhnlichen Milchsäurebakterium gelangen konnte.

Serie 4.

Konsummilch, geimpft mit frischem Erdnußmehl A.

Herstellung der Proben wie üblich. Die Untersuchung ergab in der Vorprüfung:

Kurze Bezeichnung der Probe	M I	M II	M III
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	15 Stunden	32 Stunden	64 Stunden
Makroskopisches Aussehen . .	feinflockig geronnen	gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	noch normal	etwas unrein sauer	sauer-bitterlich
Säuregrad	14 n/10 NaOH	15.3 n/10 NaOH	16,8 n/10 NaOH

Mikroskopische Prüfung: Das Anlegen und die Untersuchung der Kulturen fand wie üblich statt. Von einer spezialisierten Darstellung des quantitativen Wachstumsverhältnisses der verschiedenen Arten auf den einzelnen verwendeten Nährböden wird hier, sowie bei allen folgenden Serien, der Kürze halber, abgesehen. — Auf die einzelnen Proben entfallen folgende Gesamtzahlen von Bakterien:

Zahlen in Millionen pro ccm.

Bakterienart	M I (37° C)		M II (22° C)		M III (12° C)	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	500	19	110	13
Bacterium coli	—	—	—	—	40	5
Bacterium acidi lactici . . .	110	8	—	—	30	3
Bacterium aërogenes	—	—	—	—	50	6
Bacterium Güntheri	1300	92	2200	81	630	73
Langsam verflüss. Kokken .	5	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1415	100	2700	100	860	100

Wie schon von vornherein zu erwarten war, trat die makroskopische Veränderung der geimpften Milchproben um so später ein, je niedriger die Aufbewahrungstemperatur gewählt wurde. Bei der bei 12° C aufbewahrten Milch, mußte volle 64 Stunden gewartet werden, bis sich die ersten Anzeichen einer Veränderung zeigten. Weder bei 37° noch bei 12° C trat, trotz der großen Zahl von Bacterium Güntheri, die normale, gallertige Gerinnung der Milch ein; nur bei 22° C war dies der Fall. Die Säuregrade nehmen sowohl mit längerer Aufbewahrungszeit, als auch mit niedriger Aufbewahrungstemperatur zu.

Was zunächst die Probe M I betrifft, so ist hervorzuheben, daß hier, genau so wie bei der analogen Kontrollmilch, eine weit überwiegende Milchsäuregärung stattgefunden hat. An beiden Orten spielt Bacterium Güntheri die Hauptrolle, doch kommen bei der geimpften Probe die Gasbildner viel entschiedener zur Geltung. Hier machen sie 8 Proz. der Gesamtkeimzahl aus; dort erreichen sie bloß $^1/_7$ Proz. des jeweiligen Keimgehaltes. Ferner finden sich in Probe M I peptonisierende Kokken in leicht nachweisbarer Menge, während diese bei der Kontrollmilch gänzlich fehlen. Die Wirkung der Impfung macht sich also — wenn auch nicht in intensiver

Weise — in der Flora der Milch M I doch deutlich geltend, besonders auch im etwas früheren Eintritt der makroskopischen Veränderung der Probe.

Etwas auffallen muß auf den ersten Blick, daß die geimpfte Milch M I „nur“ 1415 Millionen Bakterien pro Kubikzentimeter aufweist, während in der zugehörigen Kontrollprobe 2103 Millionen pro Kubikzentimeter gezählt wurden. Diese bedeutende Differenz läßt sich aber dadurch erklären, daß sich die natürliche Flora in der Milch nicht gleich anfangs ungehindert entwickeln konnte, sondern wohl zuerst in einen gewissen Konkurrenzkampf mit der mannigfaltigen, durch die Impfung hereingebrachten Fremdflora treten mußte. Besonders ist aber ausschlaggebend der Umstand, daß die Kontrollprobe volle 3 Stunden länger in Gärung belassen werden mußte, bis sie deutliche Anzeichen makroskopischer Veränderung zeigte.

Fast ähnliche Verhältnisse treffen wir zwischen der geimpften Milch M II und der entsprechenden Kontrollprobe K b. Hier hat die Impfung neben früherer Veränderung der Probe eine wesentliche Begünstigung des Bacterium fluorescens bewirkt. Am meisten jedoch lassen sich die Folgen der Impfung bei einem Vergleich der Proben M III und K c wahrnehmen. Hier kommen die durch die Impfung hereingebrachten gasbildenden Milchsäurebakterien der Coli-aërogenes-Gruppe ganz auffallend zur Geltung (14 Proz.!).

Wir können also die Versuchsergebnisse der Serie 4 dahin zusammenfassen, daß eine Impfung oder Verunreinigung der frischen Milch mit frischem Erdnußmehl in der vorgenommenen Menge (auf 100 ccm $^1/_{100}$ g) im allgemeinen auf die qualitative Zusammensetzung der Pilzflora nur einen geringen Einfluß ausübt, daß dagegen die Haltbarkeit der Milch merklich herabgemindert werden kann.

Serie 5.

Frische Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl A, das angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war. (Vergl. p. 100.)

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie im allgemeinen Teil beschrieben.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M I a	M I b	M I c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchung	15 Stunden	34 Stunden	72 Stunden
Makroskopisches Aussehen	feinflockig geronnen	gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	unrein sauer	unrein sauer	sauer, stark bitter
Säuregrad	12,5 n/10 NaOH	14,2 n/10 NaOH	16,2 n/10 NaOH

Die Bakterienflora (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	1900	39	980	46
Bacterium acidi lactici	100	7	—	—	30	1
Bacterium Güntheri	1200	93	2970	61	1140	53
Verflüssigende Kokken	4	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1304	100	4870	100	2150	100

Was vorerst die Gesamtkeimzahl betrifft, so verhält sich die Probe M Ia vorstehender Serie zur korrespondierenden Kontrollmilch K a fast genau wie die mit frischem Material geimpfte Milch M I. Die Gesamtbakterienzahl ist, entsprechend der hier kürzeren Zeitspanne vom Ansetzen der Probe bis zu deren makroskopischen Veränderung etwas kleiner geblieben. Das **Bacterium Güntheri** ist infolge stärkeren Auftretens der Gasbildner quantitativ etwas zurückgedrängt worden; ebenso finden wir auch in Probe M I a, wie früher in Probe M I, die letzten Reste der im Impfmaterial ursprünglich in bedeutender Menge vorhandenen Kokkenflora.

Im Gegensatz zu Probe M I a erweisen sich die bei 22° und 12° C aufbewahrten Milchproben, trotz der gleichen Gärdauer wie die analogen nicht geimpften Proben, ganz bedeutend bakterienreicher als diese. Während in der Kontrollmilch bei 22° C pro Kubikzentimeter „nur“ 1520 Millionen Keime nachweisbar waren, fanden sich in der zugehörigen, mit 24 Stunden altem, gärendem Erdnußmehl geimpften Probe 4870 Millionen Spaltpilze, also eine um mehr als dreimal so große Zahl.

Auch die bei 12° C aufbewahrte Milch M I c weist 2150 Millionen Bakterien pro Kubikzentimeter auf gegenüber 1080 Millionen der bezüglichen Kontrollprobe. — Durch die Einimpfung von gärendem Material wurde auch hier das **Bacterium fluorescens** begünstigt; denn sowohl in Milch M I b als M I c hat es auf Kosten des **Bacterium Güntheri** eine bedeutende Zunahme erfahren. Wir können also sagen, daß sich die Ergebnisse aus den Versuchen der Serie 5 fast vollständig mit jenen der Serie 4 decken, besonders was den Einfluß des Impfmaterials in qualitativer Hinsicht anbetrifft.

Serie 6.

Frische Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl A, das angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war. (Vergl. p. 102.)

Durchführung der Versuche wie bei den vorhergehenden Serien.

Makroskopische Vorprüfung:

Kurze Bezeichnung	M II a	M II b	M II c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Untersuchung	15 Stunden	33 Stunden	70 Stunden
Makroskopisches Aussehen	feinflockig geronnen, kein Gas	gallertig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	normal sauer	scharf kratzend sauer	stark sauer u. sehr scharf bitter
Säuregrad	12,8 n/10 NaOH	14,0 n/10 NaOH	16,5 n/10 NaOH

Die Bakterienflora (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M II a		M II b		M II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	180	10	850	45
Bacterium acidi lactici	20	2	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	1200	95	1700	90	1020	55
Langsam verflüss. Coccus	22	2	—	—	—	—
Sproßpilz	10	1	—	—	—	—
	1252	100	1880	100	1870	100

Hauptergebnisse: Verminderte Gesamtkeimzahl bei Probe M IIa gegenüber der Kontrollprobe (kürzere Gärdauer, Konkurrenz der Impfflora); vermehrter Gehalt an Spaltpilzen bei den beiden anderen Milchproben M IIb und M IIc; ferner stufenweise Abnahme des **Bacterium Güntheri** mit abnehmender Aufbewahrungstemperatur der Versuchsproben und steigende Entwicklung des Bacterium fluorescens. Eine etwas unreinere Milchsäuregärung kennzeichnete auch hier die geimpften Proben von den analogen Kontrollproben.

Serie 7.

Frische Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl A, das angefeuchtet 4 Tage bei 37° C. war. (Vergl. p. 102.)

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M III a	M III b	M III c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	14 Stunden	34 Stunden	72 Stunden
Makroskopisches Aussehen	feinflockig geronnen	gallertig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	rein sauer	scharf sauer mit schwach bitterm Nachgeschmack	stark sauer und scharf bitter
Säuregrad	12,5 n/10 NaOH	14,1 n/10 NaOH	16,6 n/10 NaOH

Bakterienflora (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M III a		M III b		M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	180	4	780	39
Bacterium acidi lactici	4	—	—	—	80	4
Bacterium Güntheri	1400	100	4000	96	1140	57
Sproßpilz	2	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1406	100	4180	100	2000	100

Die makroskopisch wahrnehmbare Veränderung ist bei Probe MIIIa dieser Serie sehr früh eingetreten. Doch ist die Gärung eine sozusagen ausschließlich reine Milchsäuregärung, wie bei der nicht geimpften Parallelprobe. Ein ganz bescheidener Einfluß des Impfmaterials auf den natürlichen Säuerungsprozeß äußert sich also nur in der etwas beschleunigten Gerinnung der Milch. — Auch bei Probe MIIIb kann von einer wirksamen Beeinflussung der Pilzflora durch das gärende Impfmaterial nur insofern die Rede sein, als durch die Impfung eine ganz bedeutende Menge des Bacterium Güntheri in die Milch kam. Dadurch trat dann einerseits eine mehr ausgesprochene Milchsäuregärung ein als bei der Kontrollprobe, andererseits wurde durch Vermehrung der Milchsäurebildner eine frühere Gerinnung der Milch herbeigeführt.

Die Probe bei 12° C zeigt keine durchgreifenden Unterschiede gegenüber der ungeimpften Kontrollprobe.

Serie 8.

Frische Konsummilch, geimpft mit gärendem Erdnußmehl A, das 24 Stunden bei 22° C war. (Vergl. p. 103.)

Die Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben geschah in üblicher Weise. Als Impfmaterial diente die auf p. 103 unter dem Namen Erdnußmehl II a untersuchte Erdnußmehlprobe.

Die Vorprüfung der makroskopisch veränderten Milch ergab bei:

Probe	M IV a	M IV b	M IV c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	32 Stunden	71 Stunden
Makroskopisches Aussehen	ziegerig geronnen, Gas!	fest gallertig geronnen; Gasbildung	ganz feinflockig geronnen; Gasbildung
Geschmack	säuerlich-bitter	noch normal	unrein sauer
Säuregrad	13,3 n/10 NaOH	12,6 n/10 NaOH	15,7 n/10 NaOH

Die Flora (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IV a		M IV b		M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	460	25
Bacterium acidi lactici	1100	42	20	1	20	1
Bacterium aërogenes	500	19	400	9	—	—
Bacterium Güntheri	1000	39	4100	90	1360	74
Gesamtzahlen	2600	100	4520	100	1840	100

Trotzdem im Impfmaterial die Gasbildner der Coli-aërogenes-Gruppe nur in sehr untergeordneter Menge vorhanden waren und auch in der verwendeten Milch nicht allzu sehr in den Vordergrund traten, haben sie sich in Probe MIVa doch zu ganz bedenklichem Prozentsatz entwickelt. Das Bacterium Güntheri vermochte nur zu einer Vertretung von 39 Proz. zu gelangen, während volle 61 Proz. von Bacterium acidi lactici und Bacterium aërogenes beansprucht werden. Hier vermochte also die Impfung im Verein mit der Ursprungsflora der Milch, im Gegensatz zu den Ergebnissen der bisherigen Serien, einen sehr großen Einfluß auf die Flora auszuüben.

MIVb unterscheidet sich von der Kontrollprobe hauptsächlich dadurch, daß an Stelle des Bacterium fluorescens die Gasbildner getreten sind. In der geimpften Milch ist eine nur um 3 Stunden raschere makroskopische Veränderung festzustellen, obwohl die Keimzahl rund dreimal so hoch ist. — Auch die geimpfte Probe bei 12° C weist einen bedeutenden Mehrgehalt an Bakterien auf gegenüber der Kontrollmilch. Qualitativ aber ist sich der Bestand ungefähr gleich geblieben.

Der Einfluß der Impfung nimmt also mit sinkender Aufbewahrungstemperatur der Milch wesentlich ab.

Serie 9.

Frische Konsummilch, geimpft mit gärendem Erdnußmehl A, das 48 Stunden bei 22° C war. (Vergl. p. 103.)

Herstellung, Impfung und Untersuchung der Proben wie üblich. — Sofort nach der Impfung wurden die Erlenmeyerkölbchen, welche die geimpfte Milch enthielten, zu den betreffenden Temperaturen gestellt und regelmäßig auf die makroskopische Veränderung geprüft. Diese trat, wie bei allen anderen Serien, zuerst bei der zu 37° C gestellten Probe auf.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M V a	M V b	M V c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	17 Stunden	34 Stunden	72 Stunden
Makroskopisches Aussehen .	feinflockig geronnen, Gasbildung	gallertig geronnen, Gas	feinflockig geronnen
Geschmack	unrein sauer; bitterlicher Nachgeschmack	rein sauer	scharf sauer und ziemlich bitter
Säuregrad	14,9 n/10 NaOH	15,1 n/10 NaOH	16,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	50	2	720	32
Bacterium acidi lactici . . .	200	11	20	1	110	5
Bacterium aërogenes	300	17	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	1300	72	1960	97	1440	63
Gesamtzahlen	1800	100	2030	100	2270	100

Die Untersuchungsresultate sind auch hier, ähnlich wie bei früheren Serien, nur auszugsweise wiedergegeben. Probe V c wurde mit je drei verschiedenen Nährböden auf Gelatine- und Agar-Plattenkulturen und auf hohe Schichtkultur verarbeitet. Es ergab sich, daß zur Untersuchung von gärender Milch als geeignetste Nährböden sich erwiesen — in Übereinstimmung mit früheren Befunden — Molkengelatine- und Milchzuckeragarplatten, sowie Milchzuckeragar hohe Schichtkultur.

Ein Vergleich dieser Serie mit der vorhergehenden zeigt, daß besonders in Probe MVa und MVb eine nicht unbedeutende Verschiebung der Flora zugunsten von Bacterium Güntheri stattgefunden hat. Bei MVc ist keine große Veränderung festzustellen.

Im allgemeinen kann gesagt werden, daß durch das zweitägige Impfmaterial die natürliche Veränderung der Milch bedeutend weniger beeinflußt wurde als durch das bloß 24 Stunden alte Material.

Serie 10.

Frische Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl A, das angefeuchtet 4 Tage bei 22° C war (vergl. p. 103).

Herstellung der Proben, sowie Verarbeitung der veränderten Milch auf die entsprechenden Nährböden wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M VI a	M VI b	M VI c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	16 Stunden	34 Stunden	72 Stunden
Makroskopisches Aussehen .	ziegerig geronnen, Gas	gallertig geronnen, Gas	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	bitterlich-sauer	unrein sauer	kratzend sauer, bitter
Säuregrad	13,2 n/10 NaOH	13,4 n/10 NaOH	17,4 n/10 NaOH

Bakterienflora (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M VI a		M VI b		M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	150	8	410	31
Bacterium coli	20	1	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	180	13	120	7	50	4
Bacterium aërogenes	600	43	40	2	—	—
Bacterium Güntheri	600	43	1500	83	870	65
Gesamtzahlen	1400	100	1810	100	1330	100

Vor allem bei Probe M VI a tritt die Einwirkung des Gärmaterials augenscheinlich hervor. Die Gesamtbakterienzahl ist zwar geringer als diejenige der korrespondierenden Kontrollprobe. Dagegen sind die Gasbildner der Coli-aërogenes-Gruppe in ganz entschiedener Weise zur vorherrschenden Vertretung gelangt. Sie machen hier 57 Proz. des Bestandes aus, während Bacterium Güntheri, das doch in der ungeimpften Milch volle 100 Proz. erreichte, hier auf 43 Proz. der Gesamtflora zurückgedrängt wurde.

Auch bei M VI b läßt sich der Einfluß des eingeimpften, gärenden Erdnußmehles unverkennbar feststellen. Das Bacterium Güntheri mußte hier ebenfals zurücktreten und zwar zugunsten von Bacterium fluorescens und der Acidi-lactici-aërogenes-Gruppe. — Die kleinsten Differenzen zwischen der geimpften und ungeimpften Milch machen sich bei den zu 12° C gestellten Proben bemerkbar.

C. Wirkung von Erdnußmehl A in frischem und gärendem Zustande auf sterile Milch.

Die zu den Serien 11—17 verwendete Milch wurde am Morgen des 6. Januar 1910 von der sogenannten „Spitalscheune" in Zürich unmittelbar nach dem Melken abgeholt und sofort zu 100 ccm in Erlenmeyer kölbchen von 150 ccm Inhalt mittels steriler Pipette abgemessen; dann erfolgte durch Einsetzen in den Autoklaven (¾ Std. bei ½ Atmosphäre Überdruck) die Sterilisation. Die auf diese Weise keimfrei gemachte Milch wurde nach vollständigem Erkalten zu allen in den folgenden Serien angeführten Versuchen verwendet.

Serie 11.

Sterile Milch, geimpft mit frischem Erdnußmehl A.

Die Impfmenge betrug, wie bei der frischen Milch, $^1/_{100}$ g Erdnußmehl auf 100 ccm Milch. Die Milchproben wurden ebenfalls sofort nach deutlicher makroskopischer Veränderung qualitativ und quantitativ bakteriologisch untersucht und zwar wurden überall, mit Ausnahme einer Serie, Molkengelatineplatten, Milchzuckeragarplatten und Milchzuckeragar hohe Schicht in der notwendigen Zahl von Verdünnungen angelegt.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S I	S II	S III
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	4 Tage	11 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	käsig-ziegerig geronnen; stark gebläht	feinflockig geronnen; Gas!	gallertig geronnen; schwach Gas
Geschmack	talgig-bitterlich	widerlich säuerlich-bitter	stark sauer mit bitterm Nachgeschmack
Säuregrad	8,5 n/10 NaOH	13,6 n/10 NaOH	20,6 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S I		S II		S III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	60	2	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	10	—	2	—
Bacterium coli	—	—	—	—	20	1
Bacterium acidi lactici . . .	40	15	180	8	300	20
Bacterium aërogenes	180	70	30	1	—	—
Schleimbildende Bact. Güntheri	—	—	—	—	200	13
Normale Bact. Güntheri . .	40	15	2200	89	1000	66
Gesamtzahlen	260	100	2480	100	1522	100

Was zunächst die Zeitdauer von der Impfung bis zur makroskopischen Veränderung anbetrifft, so erscheint diese bei allen 3 vorstehenden Proben bedeutend länger als bei den analogen, mit gleichem Impfmaterial beschickten Frischmilchproben. Die bei 37° C aufgestellte Milch war zwar schon nach 18 Stunden sehr stark gebläht und zeigte eine käsig-ziegerige Gerinnung. Allein bei der zu 22° C verbrachten Milch ging es 4, bei jener, die zu 12° C kam, sogar 11 volle Tage bis zur ersten, von bloßem Auge bemerkbaren Veränderung.

Der Vergleich der Flora vorstehender 3 Milchproben mit jener des Impfmaterials zeigt uns auf den ersten Blick, daß das neue Nährmedium einer scharfen Auslese in der Flora rief. Von den 25 im frischen Erdnußmehl nachgewiesenen Arten sind nur noch 4 geblieben und auch von diesem Rest kommt eigentlich nur den gasbildenden Milchsäurebakterien eine weitere Bedeutung zu. Speziell in der bei 37° C aufgestellten Probe macht die Coli-aërogenes-Gruppe volle 85 Proz. der gesamten Bakterienzahl aus, geht dann aber bei S II auf 9 Proz. zurück, um bei S III wieder auf 21 Proz. anzusteigen. Bemerkenswert ist besonders auch die Differenzierung einer schleimbildenden Güntheri-Form bei 12° C. Diese Form bildet offenbar eine Seitenlinie der nichtschleimbildenden Organismen und konnte sich voraussichtlich infolge der niederen Temperatur ausbilden.

Serie 12.

Einwirkung von Erdnußmehl A, das angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war, auf sterile Milch. (Vergl. p. 100.)

Herstellung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S I a	S I b	S I c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur Veränderung . .	17 Stunden	60 Stunden	18 Tage
Makroskopisches Aussehen .	fest käsig geronnen	ganz feinflockig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	unrein säuerlich	schwach schottenartig süßlich	säuerlich mit schwachem Stich ins Bittere
Säuregrad	11,2 n/10 NaOH	11,2 n/10 NaOH	15,0 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Entsprechend dem als Impfmaterial benutzten Erdnußmehl, das nach 24-stündiger Gärung bei 37° C fast ausschließlich nur Bacterium Güntheri aufwies, wurde auch in der ehemals sterilen Milch dieser Spaltpilz

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S I a		S I b		S I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus subtilis	—	—	2	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	—	—	20	2	—	—
Sproßpilz	—	—	—	—	20	1
Bacterium Güntheri	900	100	1200	98	1900	99
Gesamtzahlen	900	100	1222	100	1920	100

sozusagen zum Alleinherrscher. Einzig Bacterium acidi lactici kam bei 22° C und der offenbar durch das Impfmaterial hereingebrachte Sproßpilz bei 12° C zu einiger Bedeutung.

Serie 13.

Einwirkung von gärendem Erdnußmehl A, das 48 Stunden bei 37° C war, auf sterile Milch. (Vergl. p. 102).

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S II a	S II b	S II c
Temperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	3½ Tage	9 Tage
Makroskopisches Aussehen .	kompakt käsig geronnen	flüssig bis leicht gallertig geronnen	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	säuerlich	unrein säuerlich mit labartigem Nachgeschmack	säuerlich
Säuregrad	12,6 n/10 NaOH	14,7 n/10 NaOH	15,0 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S II a		S II b		S II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium . . .	—	—	2	—	1	—
Sproßpilz	—	—	30	3	10	1
Bacterium Güntheri	2000	100	1000	97	1700	99
Gesamtzahlen	2000	100	1032	100	1711	100

Die Untersuchungsergebnisse dieser Serie decken sich fast vollständig mit jenen der Serie 12. Überall ist das Bacterium Güntheri in konkurrenzlosem Übergewicht.

Serie 14.

Einwirkung von gärendem Erdnußmehl A, das 4 Tage bei 37° C war, auf sterile Milch. (Vergl. p. 102).

Herstellung und Verarbeitung der Proben nach üblicher Weise.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Proben	S III a	S III b	S III c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	17 Stunden	3½ Tage	11 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	kompakt käsig geronnen	feinflockig geronnen	leicht gallertig geronnen
Geschmack	säuerlich-bitter	säuerlich	säuerlich-bitter
Säuregrad	13,3 n/10 NaOH	12,3 n/10 NaOH	13,4 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S III a		S III b		S III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium . . .	0,9	—	3,0	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	0,4	—	—	—
Sproßpilz	1,1	—	10,0	1	20	2
Bacterium Güntheri	700,0	100	900,0	99	900	98
Gesamtzahlen	702,0	100	913,4	100	920	100

Im Impfmaterial (siehe p. 102) waren 99 Proz. Güntheri; daneben Sproßpilze, Bact. Zopfii Kurth, Bact. acidi lactici und Bacterium fluorescens, in ganz schwacher, kaum noch nachweisbarer Menge auch Heu- und Kartoffelbazillen und einige Kokken vertreten. Die 2 Hauptarten des Impfmaterials, das Bact. Güntheri und der Sproßpilz, kehren auch in der Flora der geimpften Milch wieder. Die andern Spezies sind entweder in nur sehr kleiner Menge vertreten oder aber gar nicht mehr nachweisbar.

Ziehen wir eine Parallele zwischen vorstehender Serie und der mit dem gleichen Impfmaterial geimpften Konsummilch der Serie 7, so zeigen sich folgende Hauptunterschiede: Wesentlich größere Gesamtkeimzahl in allen Proben der Serie 7, ferner frühere makroskopische Veränderung aller Proben, wo gewöhnliche Konsummilch als Nährflüssigkeit benützt wurde und endlich ganz ausgesprochen besseres Wachstum von Bacterium fluorescens bei 12° C in unveränderter als in steriler Milch.

Serie 15.

Einwirkung von gärendem Erdnußmehl A, das angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war, auf sterile Milch. (Vergl. p. 103.)

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S IV a	S IV b	S IV c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	15 Stunden	2½ Tage	8½ Tage
Makroskopisches Aussehen .	feinflockig-griesig geronnen; Blähung	kompakt geronnen; deutlich Gas	gallertig geronnen, schwach Gas
Geschmack	säuerlich-bitter	stark sauer, bitter	sauer, mit talgig bitterm Nachgeschmack
Säuregrad	10,9 n/10 NaOH	17,0 n/10 NaOH	17,5 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S IV a		S IV b		S IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	100	5
Bacillus subtilis	—	—	20	1	—	—
Bacterium coli	—	—	20	1	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	130	15	60	4	100	5
Bacterium aërogenes	50	6	30	2	10	—
Bacterium Güntheri	710	79	1320	92	1800	90
Gesamtzahlen	890	100	1450	100	2010	100

Bacillus mesentericus, sowie der gelbe Gasbildner und der gelbe Säurebildner, die schon im Impfmaterial in verhältnismäßig schwacher Menge vorhanden waren, vermochten in der sterilen Milch bei keiner Aufbewahrungstemperatur aufzukommen. Dagegen haben sich die gasbildenden Milchsäurebakterien mehr Geltung verschafft. Im Impfmaterial nahmen sie kaum ¼ Proz. der Flora ein, in der vorstehenden Serie jedoch 21 Proz., bzw. 7 Proz., bzw. 5 Proz. der Gesamtkeimzahl. Dadurch wurde das Bacterium Güntheri entsprechend zurückgedrängt. — Stellen wir die Flora dieser Serie jener mit dem gleichen gärenden Erdnußmehl geimpften Konsummilchproben der Serie 8 gegenüber, so zeigt sich sofort, daß in gewöhnlicher Konsummilch der Einfluß der Gasbildner bei einer Aufbewahrungstemperatur von 37° C eine unvergleichlich größere Bedeutung erlangt, als dies bei steriler Milch der Fall ist. Hier beansprucht die genannte Bakteriengruppe nur 21 Proz., dort aber 61 Proz. der Gesamtflora. Auch bei 22° C herrschen, obschon in stark abgeschwächtem Maße, ähnliche Verhältnisse, während die Coli-aërogenes-Gruppe bei 12° C, besonders zugunsten des Bacterium fluorescens, wenig Bedeutung mehr hat.

Serie 16.

Einwirkung von gärendem Erdnußmehl A, das 48 Stunden bei 22° C war, auf sterile Milch. (Vergl. p. 103).

Herstellung der sterilen Milch, Impfung derselben, Aufbewahrung und Untersuchung der makroskopisch veränderten Proben wie gewöhnlich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S V a	S V b	S V c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	15 Stunden	48 Stunden	7 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	feinflockig-griesig geronnen, Blähung	leicht gallertig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	schottenartig, bitter	ziemlich stark sauer mit deutlich bitterm Nachgeschmack	stark sauer, intensiv bitter
Säuregrad	11,3 n/10 NaOH	16,6 n/10 NaOH	20,6 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S V a		S V b		S V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	80	5	1800	44
Bacterium acidi lactici . . .	120	15	20	1	100	2
Bacterium aërogenes	80	10	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	610	75	1380	94	2200	54
Gesamtzahlen	810	100	1480	100	4100	100

Sowohl bei Serie 15 als 16 nimmt die Zahl der Keime mit abnehmender Temperatur stark zu. Besonders bemerkenswert sind die Proben bei 37° C. Hier gewinnen, im Gegensatz zu den analogen Proben der Serien 12, 13 und 14, die Gasbildner wieder einen großen Prozentsatz der Flora. Typisch ausgebildet ist das Bacterium aërogenes. — Bei Probe S V c macht Bact. fluorescens einen selten erreichten Teil der Keimzahl aus. Ihm ist offenbar der stechend bittere Nachgeschmack der Milch zuzuschreiben. Einen schwachen Bittergeschmack kann nach unsern Beobachtungen auch die Coli-aërogenes-Gruppe unter Umständen bewirken.

Serie 17.

Einwirkung von gärendem Erdnußmehl A, das angefeuchtet 4 Tage bei 22° C war, auf sterile Milch (Vgl. p. 103).

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S VI a	S VI b	S VI c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	17 Stunden	3½ Tage	7½ Tage
Makroskopisches Aussehen	leicht gallertig geronnen, viel Gas	grobflockig geronnen, mäßig Gas	feinflockig geronnen
Geschmack	fade säuerlich mit Stich ins Bittere	stark sauer, widerlicher Nachgeschmack	sauer u. bitter
Säuregrad	10,6 n/10 NaOH	16,8 n/10 NaOH	14,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S VI a		S VI b		S VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium coli	—	—	—	—	30	2
Bacterium acidi lactici	100	15	120	8	160	9
Bacterium aërogenes	80	12	40	3	40	2
Bacterium Güntheri	500	73	1260	89	1470	87
Gesamtzahlen	680	100	1420	100	1700	100

Wie aus Serie 2 p. 103 ersichtlich ist, bestand die Flora des Impfmaterials nur aus Milchsäurebakterien; nämlich aus 83 Proz. Güntheri und 17 Proz. Coli-aërogenes. Das Verhältnis ist nun auch in vorstehender, geimpfter Milch annähernd dasselbe geblieben. Bei 37° C stieg zwar die Zahl der Gasbildner auf 27 Proz., sank aber bei 22° C auf 11 Proz., um bei 12° C wieder auf 13 Proz. der Gesamtflora anzusteigen. In der Milch bei 12° C hat sich auch das Bacterium coli entwickelt; im übrigen ist der Bakterienbestand dieser Serie also ein ziemlich getreues Abbild von der Flora des Impfmaterials.

D. Zusammenstellung der Hauptergebnisse.

a) Die Flora des Impfmaterials.

Bezeichnung der Probe	Zeit und Temperatur der Gärung		Gesamtkeimzahl in Millionen pro g lufttrockenen Materials	Vermehrungsquotient, auf die urspr. Keimzahl bezogen	Hauptvertreter in %		
	Tage	Grad C			B. Güntheri	Coli-aërog.-Gruppe	Peptonisierende
Erdnußmehl A							
Frisches Material	—	—	0,592	—	—	9	44
Serie 1							
Erdnußmehl I a	1	37	294 002	496 621	100	—	—
„ I b	2	37	6 351,1	10 728	99	+[1]	+
„ I c	4	37	2 423,5	4 093	99	+	+
Serie 2							
Erdnußmehl II a	1	22	3 215	5 431	100	+	—
„ II b	2	22	1 964	3 317	97	1	+
„ II c	4	22	970	1 639	83	17	—

---

[1] + bedeutet: Anwesend, aber in prozentuell nicht faßbarer Zahl.

b) Gesamtkeimzahlen der geimpften Milchproben pro ccm.

No. der Serie	Art der Milchprobe	Gesamtzahl der Keime in Mill. bei einer Aufbewahrungstemperatur von: 37° C	22° C	12° C
3	Kontrollmilchproben	2103	1520	1080
4	Milch + frisches Erdnußmehl A	1415	2700	860
5	Milch geimpft mit Gärmaterial bei 37° C	1304	4870	2150
6		1252	1880	1870
7		1406	4180	2000
8	Milch geimpft mit Gärmaterial bei 22° C	2600	4520	1840
9		1800	2030	2270
10		1400	1810	1330
11	Sterile Milch + frisches Erdnußmehl A	260	2480	1522
12	Sterile Milch geimpft mit Gärmaterial bei 37° C	900	1222	1920
13		2000	1032	1711
14		702	913,4	920
15	Sterile Milch geimpft mit Gärmaterial bei 22° C	890	1450	2010
16		810	1480	4100
17		680	1420	1700

c) Die wichtigsten Bakterienarten in %:

Art der Milchprobe	No. der Serie	Flora bei 37° C: Fluoreszierende	Acidi-coli-Grupp.	B. aërogenes	B. Güntheri	Andere Arten	Flora bei 22°C: Fluoreszierende	Acidi-coli-Grupp.	B. aërogenes	B. Güntheri	Andere Arten	Flora bei 12°C: Fluoreszierende	Acidi-coli-Grupp.	B. aërogenes	B. Güntheri	Andere Arten
1. Kontrollproben	3	—	+[1]	—	100	—	9	—	—	91	—	31	—	—	69	—
2. Konsummilch geimpft mit:																
Erdnußmehl A frisch	4	—	8	—	92	+	19	—	—	81	—	13	8	6	73	—
„ A 24 Std. bei 37° C	5	—	7	—	93	+	39	—	—	61	—	46	1	—	53	—
„ A 48 „ „ 37° C	6	—	2	—	95	3	10	—	—	90	—	45	—	—	55	—
„ A 4 Tage „ 37° C	7	—	+	—	100	+	4	—	—	96	—	39	4	—	57	—
„ A 24 Std. „ 22° C	8	—	42	19	39	—	—	1	9	90	—	25	1	—	74	—
„ A 48 „ „ 22° C	9	—	11	17	72	—	2	1	—	97	—	32	5	—	63	—
„ A 4 Tage „ 22° C	10	—	14	43	43	—	8	7	2	83	—	31	4	—	65	—
3. Sterile Milch geimpft mit:																
Erdnußmehl A frisch	11	—	15	70	15	—	+	8	1	89	2	+	21	—	79	+
„ A 24 Std. bei 37° C	12	—	—	—	100	—	—	2	—	98	+	—	—	—	99	1
„ A 48 „ „ 37° C	13	—	—	—	100	—	—	—	—	97	3	—	—	—	99	1
„ A 4 Tage „ 37° C	14	—	—	—	100	+	+	—	—	99	1	—	—	—	98	2
„ A 24 Std. „ 22° C	15	—	15	6	79	—	—	5	2	92	1	5	5	+	90	—
„ A 48 „ „ 22° C	16	—	15	10	75	—	5	1	—	94	—	44	2	—	54	—
„ A 4 Tage „ 22° C	17	—	15	12	73	—	—	8	3	89	—	—	11	2	87	—

Aus den vorstehenden Tabellen ergeben sich folgende Schlüsse:

a) Bezüglich des Verlaufes der Gärung im Erdnußmehl: Die Gärung setzt bei 37° C sehr stürmisch ein; denn innerhalb 24 Stunden ist die Zahl der Bakterien pro Gramm um rund das ½-Millionenfache angestiegen. Schon kurz nach 24 Stunden beginnt aber ein starker und andauernder Rückgang des Keimgehaltes und nach 4 Tagen ist die Zahl der im gärenden Material nachweisbaren, lebensfähigen Organismen um mehr als das hundertfache der nach einem Tage vorhandenen Keime zurückgegangen. Die erste Gärungsphase des Erdnußmehles erweist sich als fast ausschließlich reine Milchsäuregärung.

---

[1] + bedeutet: Anwesend, aber in prozentuell nicht faßbarer Zahl.

Bei 22° C verläuft der gesamte Prozeß viel langsamer, gleichmäßiger und ruhiger. Die Zahl der Bakterien steigt weniger rasch an und erreicht auch bei weitem nicht die Höhe der Keimzahlen der bei Bruttemperatur aufgestellten Proben. Zwar ist der Maximalgehalt an Mikroorganismen, wie bei 37° C, auch schon kurz nach dem ersten Tage erreicht. Doch vollzieht sich dann die rückläufige Bewegung in ziemlich gemäßigtem Tempo. Hier tritt an Stelle der allmählich etwas zurücktretenden reinen Milchsäuregärung eine Gärung, an der sich auch gasbildende Milchsäurebakterien beteiligen.

b) Die Einwirkung des Erdnußmehles auf Konsummilch. Die makroskopische Veränderung der Konsummilch, die mit angegorenem, bei 37° C aufbewahrtem Erdnußmehl in einer Menge von $^1/_{100}$ Gramm pro 100 ccm Milch geimpft wurde, tritt durchwegs bedeutend früher ein, als die Veränderung der gleichbehandelten, aber ungeimpften Kontrollproben. Wird aber das Impfmaterial bei 22° C aufbewahrt, so macht sich durch die Impfung keine so durchgehende und deutliche Einwirkung im Sinne einer verminderten Haltbarkeit der Konsummilch geltend. — Bezüglich der Bakterienzahl selbst ist, falls die geimpften Milchproben bei 37° C in Gärung belassen werden, ein tiefgreifender Unterschied nicht wahrzunehmen. Fast in allen Fällen ist die Keimzahl der geimpften Proben, entsprechend der kürzeren Gärdauer der Milch, sogar noch bedeutend kleiner, als in den Kontrollproben. Wird dagegen die geimpfte Milch bei 22° C oder 12° C aufbewahrt, so erweist sich der Bakteriengehalt beinahe regelmäßig höher als bei den Kontrollmilchproben.

c) Einwirkung auf sterile Milch. In steriler Milch ist die Wachtumsintensität der Bakterien im allgemeinen bedeutend geringer als in Konsummilch. Die makroskopische Veränderung tritt, im Falle die Proben bei 37° C aufbewahrt werden, im großen Durchschnitt ungefähr mit dem gleichen Zeitpunkt ein wie bei nichtgeimpfter, gewöhnlicher Konsummilch. Dagegen ist die Zahl der Bakterien in gewöhnlicher Konsummilch pro Maßeinheit fast ausnahmslos um mehr als einmal größer. Werden die geimpften Proben steriler Milch jedoch bei 22° C oder 12° C in Gärung belassen, so ist die Zeit von der Impfung bis zur deutlichen makroskopischen Veränderung im Durchschnitt um mehr als doppelt so groß, wie bei der analogen gewöhnlichen Milch; der Keimgehalt ist aber trotzdem ziemlich regelmäßig bedeutend kleiner.

d) Im allgemeinen hat frisches Erdnußmehl, in kleinen Quantitäten in Konsummilch gebracht, keinen bestimmenden Einfluß auf den natürlichen Gärungsverlauf der Milch. Doch kann eine Verunreinigung die Haltbarkeit derselben bei einer Aufbewahrungstemperatur von 12 bzw. 22° C um rund 2 Stunden verkürzen.

Das bei 22° C in Gärung übergegangene Erdnußmehl wirkt auf die Veränderung gewöhnlicher Konsummilch viel intensiver ein, als das bei 37° C aufbewahrte Material; denn wird Milch mit Erdnußmehl geimpft, das bei 22° C gegoren hat, so treten die Gasbildner bedeutend stärker in den Vordergrund. Immerhin findet in beiden Fällen eine gewisse Auslese der eingeimpften Spaltpilzarten statt. — Mit zunehmender Aufbewahrungstemperatur der geimpften Konsummilch nimmt auch die Einwirkung des Impfmaterials zu, was sich vor allem in der hervortretenden Störung der reinen Milchsäuregärung äußert.

In steriler Milch tritt die Entwicklung des Bacterium fluorescens (Flügge) L. et N. auffallend stärker zurück als in gewöhnlicher Konsummilch; in den meisten Fällen verschwindet es ganz.

Wird sterile Milch mit Erdnußmehl geimpft, das 1—4 Tage bei 37° C in Gärung war, so findet sich das Bacterium Güntheri L. et N., man mag die Milchproben bei 37°, 22° oder 12° C aufbewahren, ganz regelmäßig in einer Vertretung von 97—100 Proz. der Gesamtkeimzahl. Wird dagegen das Impfmaterial bei 22° C aufbewahrt, so gelangen, analog wie bei Konsummilch, in allen Fällen die gasbildenden Milchsäurebakterien der Coli-aërogenes-Gruppe in der Milch zu bedeutender Entwicklung.

5. Eingehende Untersuchung von Erdnußmehlprobe B.

A. Untersuchung des Materials selbst.

α) Erdnußmehl B frisch.

Wir sehen uns veranlaßt, die Untersuchungsresultate dieser Probe, die ganz genau in derselben eingehenden Weise behandelt wurde wie die Probe A, in gedrängter Darstellung wiederzugeben. Die Probe B wurde durch gefl. Vermittlung von Herrn J. B., Futtermittelhandlung Zürich II, direkt von Marseille bezogen. Deklariert war das Mehl als Rufisque, extra-Marke „Kuh“. Die Probe, die von Ia. Qualität und absolut tadellosem Zustande war, wurde am 24. Mai 1909 in üblicher Weise verarbeitet.

Untersuchungsergebnisse pro g:

Bacillus mesentericus	20 000 =	3 %
Bacillus subtilis	60 000 =	10 %
Bacterium fluorescens	20 000 =	3 %
Bacterium acidi lactici	35 000 =	6 %
Gelber Gasbildner	300 000 =	52 %
Gelber Säurebildner	100 000 =	17 %
Bacterium herbicola aureum	20 000 =	3 %
Unbekanntes Langstäbchen in roten Kolonien	10 000 =	2 %
Weiße Streptothrix	10 000 =	2 %
Verflüssigende Kokken	10 000 =	2 %
Gesamtzahl	585 000 =	100 %

In bezug auf die gesamte Keimzahl stehen die Proben A und B sich nahe. Doch ist die Probe B qualitativ lange nicht so kompliziert zusammengesetzt, trotzdem auch hier immerhin noch 10 Arten vorkommen. Weitaus überwiegend sind die Gas- und Säurebildner, aber auch die „Heu- und Kartoffelbazillen“ kommen, ähnlich wie in Probe A, in recht beträchtlicher Zahl vor. Eine nicht seltene Erscheinung im Erdnußmehl ist eine weiße Streptothrichae, die wir auch in späteren Proben häufig wiederfinden.

Im allgemeinen kann gesagt werden, daß auch in ausgezeichnetem Erdnußmehl die Bakterienflora sowohl quantitativ als auch qualitativ eine recht ansehnliche ist.

β) Erdnußmehl B in gärendem Zustande.

Serie 1.

Erdnußmehl B angefeuchtet bei 37° C.

Wir wogen drei Proben zu 40 g in sterilisierte Bechergläser ab und mischten mit je 80 ccm sterilem Wasser gut durch; dann wurden die Gefäße mit abgeflammten Deckeln lose zugedeckt und die so hergestellten Proben zu 37° C gestellt. Nach 24, bzw. 48 Stunden, bzw. 5 Tagen legten wir von je einer Probe in schon beschriebener Weise Kulturen an.

Makroskopische Prüfung.

Probe I a, 24 Stunden bei 37° C: Oberflächlich violett verfärbt, starke Gasbildung, säuerlicher Geruch.

Probe I b, 48 Stunden bei 37° C: Oberflächlich intensiv violett verfärbt, Gas, Geruch typisch nach Faßzieger.

Probe I c, 5 Tage bei 37° C: Oberflächlich intensiv violett verfärbt, Gasbildung zurückgegangen, Geruch wie I b.

Mikroskopischer Befund.

Zahlen in Millionen pro g lufttrockenen Erdnußmehles berechnet.

Bakterienart	Erdnußmehl I a		Erdnußmehl I b		Erdnußmehl I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus subtilis	—	—	—	—	5	1
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	31	2
Gelber Gasbildner	+1)	—	—	—	—	—
Gelber Säurebildner	40	—	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici	+	—	130	4	53	4
Schleimbildende Güntheriformen	4	—	—	—	—	—
Bacterium Güntheri, normal	66 000	99	3000	95	1300	93
Stäbchen in karminroten Kolonien	430	1	10	—	—	—
Stäbchen in ziegelroten Kolonien	20	—	—	—	—	—
Kokken	—	—	32	1	—	—
Gesamtzahlen	66 494	100	3172	100	1389	100

Quantitativ muß der gesamte Gärungsverlauf als ein Analogon der Erdnußmehlprobe A bezeichnet werden. Hier wie dort haben wir bis zum Ende des ersten Tages ein ungemein rasches Ansteigen der Keimzahl; dann aber tritt alsbald ein schneller Rückgang ein. — Nach 24 Stunden erscheint der Gehalt an Bakterien um das 113 665-fache angewachsen. Im Verlaufe von weiteren 24 Stunden aber hat ein Rückgang von ca. ums 20-fache stattgefunden und nach 5 Tagen waren noch ungefähr 2 Proz. der nach 24 Stunden vorhandenen Keime lebensfähig.

Die Qualität der Flora weist schon nach 24 Stunden eine sehr starke Verschiebung auf. Mit gewohnter Raschheit hat sich das im frischen Erdnußmehl nicht nachweisbare Bacterium Güntheri bis fast zur vollständigen Alleinherrschaft empor geschwungen. Merkwürdigerweise erscheint hier eine stark schleimbildende Form, wie wir dieser schon bei Probe A begegnet sind. Außer dem gelben Säurebildner und, in ganz schwachen Resten, dem gelben Gasbildner, hat sich in Probe I a von den 10 im frischen Material vorhandenen Arten nur ein in roten Kolonien wachsendes Stäbchen in einer zum Nachweis genügenden Zahl zu behaupten vermocht.

Die Reduktion der Arten ist nach 48 Stunden noch weiter fortgeschritten. Nun stellt sich auch Bacterium acidi lactici in größerer Zahl ein; nach 5 Tagen treten in ganz bescheidener Menge Bacillus subtilis und Bacterium fluorescens auf.

---

1) + bedeutet: Anwesend, aber in prozentuell nicht faßbarer Zahl.

Serie 2.
Erdnußmehl B angefeuchtet bei 22° C.

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie bei Serie 1. Benennung:

Gärende Probe bei 22° C während 24 Stunden = II a
„ „ „ 22° C „ 48 „ = II b
„ „ „ 22° C „ 5 Tagen = II c

Die makroskopische Vorprüfung zeigte bei II a bedeutende Gasbildung, einen faulig-säuerlichen Geruch, aber keine deutliche Verfärbung. Bei Probe II b war die oberflächliche Schicht schwach violett verfärbt, aber bedeutend weniger intensiv, wie bei der analogen Probe bei 37° C (I b). Der Geruch war säuerlich-muffig. Probe II c zeigte starke Gasbildung, an der Oberfläche bedeutende Schimmelentwicklung (Mucor), Geruch ganz deutlich nach Ammoniak, beim Umrühren der Masse ging er über in einen widerlich muffig-fauligen Geruch.

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro g).

Bakterienart	Erdnuß II a		Erdnuß II b		Erdnuß II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	20	1	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	40	1	—	—
Gelber Gasbildner	200	4	30	1	—	—
Gelber Säurebildner	—	—	20	1	—	—
Bacterium acidi lactici	300	5	8	—	250	23
Bacterium aërogenes	—	—	—	—	50	5
Bacterium Güntheri	4000	70	3000	96	780	72
Stäbchen in karminroten Kolon. .	1000	17	—	—	—	—
Kokken	100	2	—	—	—	—
Bacillus putrificus coli	100	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	5700	100	3118	100	1080	100

Von den im frischen Erdnußmehl nachgewiesenen Bakterienarten sind nach 24 Stunden bei 22° noch vier nachweisbar, die zusammen 28 Proz. der Flora des frischen Erdnußmehles ausmachen. Neu aufgetreten sind Bact. Güntheri L. et N. und in bescheidener Menge auch Bacillus putrificus Bienstock. Bact. fluorescens (Flügge) L. et N. und Bacillus mesentericus (Flügge) L. et N. vermochten erst nach 48-stündiger Gärdauer sich in untergeordneter Weise Geltung zu verschaffen. Auch in vorstehender Serie läuft schließlich nach 5 Tagen die Gärung auf eine ausgesprochen einseitige Milchsäuregärung hinaus unter weitgehendster Reduktion aller nicht milchsäurebildenden Bakterien. Bemerkenswert ist die relativ starke Vertretung der Coli-aërogenes-Gruppe nach 5-tägiger Gärung.

Aus vorstehender Serie ist deutlich ersichtlich, daß der Verlauf der Gärung bei 22° C viel ruhiger und langsamer ist, als bei 37° C. Eine so hohe Bakterienzahl wie dort wird niemals erreicht; aber hier wie dort gewinnt die Milchsäuregärung die Oberhand.

B. Einwirkung von Erdnußmehl B, frisch und in verschiedenen Gärstadien, auf Konsummilch.

a) Untersuchung der frischen Konsummilch selbst.

Die Milch wurde am 10. Juni 1909 morgens sofort nach dem Melken zur Bereitung der Proben I a bis VI a benutzt und selbst auf die übliche Weise verarbeitet.

Untersuchungsresultate.

Bacillus mesentericus	6 000 =	8 %
Bacterium fluorescens	12 000 =	15 %
Verflüssigende Kokken	26 000 =	33 %
Nichtverflüssigende Kokken	15 000 =	19 %
Bacterium acidi lactici	12 000 =	15 %
Bacterium aërogenes	5 000 =	6 %
Bacterium Güntheri	3 000 =	4 %
Gesamtzahl pro ccm	79 000 =	100 %

Den größten Prozensatz in der frischen Konsummilch machen also die Kokken aus. Diese stammen wohl zum allergrößten Teile aus dem Euter selbst, während Bacillus mesentericus, Bacterium fluorescens und die Gasbildner wohl von außen in die Milch hineingelangt sind. — Im allgemeinen kann man sagen, daß die vorstehende Milchprobe nicht sehr bakterienreich ist und daher als reinlich gewonnen bezeichnet werden darf. Im folgenden werden wir nun sehen, welchen Einfluß die Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen, sowie die Einimpfung von frischem und gärendem Erdnußmehl B auf die Milchflora ausübt.

Serie 3.

Die Kontrollmilchproben.

Kurze Bezeichnung	Ka	Kb	Kc
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makrosk. Veränderung	18 Std.	4 Tage	8 Tage
Makroskopisches Aussehen	gallertig geronnen, schwach Gas	gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	schwach sauer	stark sauer, etwas bitter	schwach labartig, deutlich bitter
Säuregrad	12,8 n/10NaOH	15,0 n/10 NaOH	8,5 n/10 NaOH

Die Bakterienflora (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	Ka		Kb		Kc	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	90	6	250	39
Bacterium coli	—	—	30	2	—	—
Bacterium acidi lactici	60	7	40	3	20	3
Bacterium Güntheri	810	93	1260	89	350	55
Verflüssigende Kokken	2	—	—	—	—	—
Sarcina	—	—	—	—	20	3
Gesamtzahlen	872	100	1420	100	640	100

Am frühesten war die Milch bei 37° C verändert. Entsprechend dem makroskopischen Aussehen war auch die Mikroflora: 93 Proz. Bact. Güntheri, der Rest, mit Ausnahme einer ganz bescheidenen Zahl von Kokken, waren Gasbildner. Bei 22° C, jedoch noch mehr bei 12° C, kommt das Bacterium fluorescens stark zur Geltung. Die Gasbildner treten mehr zurück. Doch bildet sowohl bei 22° C, als auch bei 12° C, das Bacterium Güntheri stets die vorherrschende Art.

Serie 4.

Wirkung von frischem Erdnußmehl B auf frische Konsummilch.

Die Serie setzt sich zusammen aus drei Milchproben zu 100 ccm, die mit je $^1/_{100}$ g frischem Erdnußmehl B geimpft und dann zu den drei bekannten Temperaturen von 37°, 22° und 12° C gestellt wurden. Die makroskopische Veränderung trat wie immer, so auch hier am frühesten bei der bei 37° C belassenen Milchprobe ein.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe .	M I	M II	M III
Aufbewahrungstemperatur . . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makrosk. Veränderung	18 Std.	6 Tage	8 Tage
Makroskopisches Aussehen . . .	gallertig geronnen	gallertig geronnen	feinflockig geronnen, schwache Gasbildung
Geschmack	rein sauer	stark kratzend, sauer u. bitter	wenig sauer, sehr stark bitter
Säuregrad	12,5 n/10 NaOH	16,3 n/10 NaOH	6,3 n/10 NaOH

Die Bakterienflora (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I		M II		M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	780	35	500	73
Bacterium acidi lactici	20	1	200	9	80	12
Verflüssigende Kokken	15	1	100	5	—	—
Bacterium Güntheri	1210	98	1130	51	100	15
Gesamtzahlen	1245	100	2210	100	680	100

Im frischen Erdnußmehl, das als Impfmaterial diente, waren zehn verschiedene Arten, in der als Nährflüssigkeit benutzten frischen Konsummilch sieben Spezies vorhanden. Von dieser ziemlich kompliziert zusammengesetzten Mikroflora haben sich, wie die vorstehende Zusammenstellung zeigt, nur vier Arten zu halten vermocht. Alle anderen sind zugrunde gegangen, oder sie haben sich doch in einer so geringen Zahl vermehrt, daß ein Nachweis nicht mehr möglich war.

Die Bakterienmenge der frischen Milch betrug 79000 pro Kubikzentimeter. Durch die Impfung von $^1/_{100}$ g Erdnußmehl in 100 ccm Milch wurde diese Zahl noch um 58—59 Keime ($^1/_{10\,000}$ von 585000) pro Kubikzentimeter geimpfte Milch erhöht, so daß also die gesamte Bakterienmenge der letzteren pro Kubikzentimeter unmittelbar nach der Impfung 79058 betrug. Wenn wir nun bloß die gesamte Keimzahl ohne Rücksicht auf die einzelnen Arten, die in der frisch geimpften Milch einerseits und in der makroskopisch veränderten Milch andererseits vorhanden waren, ins Auge fassen, so ergibt sich bei Probe M I innerhalb 18 Stunden eine Vermehrung von ums 15747-fache. In Milch M II stieg die Keimzahl in der Zeit von 6 Tagen von 79058 auf 2210 Millionen, was einem Vermehrungsquotienten von 27954 entspricht; bei Probe M III dagegen ist die analoge Zahl bloß 8601. Alle diese Zahlen erscheinen selbstverständlich ganz erheblich größer, wenn wir nur diejenigen Arten berücksichtigen, welche der Mikroflora der Milch sofort nach der Impfung und jener nach Ablauf der entsprechenden Gärzeiten gemeinsam sind.

Die Artenzahl in den bei verschiedenen Gärtemperaturen aufgestellten Milchproben erscheint, wie bereits angedeutet, sehr stark reduziert. Im ganzen sind in allen drei Gärproben der Serie nur vier verschiedene Arten nachweisbar, von denen bloß drei allen Proben gemeinsam sind. Das Bacterium fluorescens vermochte bei 37° C nicht aufzukommen, nahm aber bei 22° C 35 Proz. und bei 12° C sogar 73 Proz. der gesamten Keimzahl in Anspruch. Von diesem Organismus her rührt auch, wie wir früher schon bemerkt haben, der widerlich-bittere Geschmack der Milch.

Serie 5.

Wirkung von Erdnußmehl B, das 24 Stunden bei 37° C war, auf Konsummilch (vergl. p. 121).

Makroskopische Prüfung der veränderten Proben.

Kurze Bezeichnung der Probe	M I a	M I b	M I c
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makrosk. Veränderung	16 Std.	6 Tage	8 Tage
Makroskopisches Aussehen	gallertig geronnen	typisch gallertig geronnen	flockig geronnen
Geschmack	scharf sauer	scharf sauer, bitter	widerlich talgig, stark bitter
Säuregrad	13,1 n/10 NaOH	14,9 n/10 NaOH	3,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	100	6	300	79
Bacterium acidi lactici	10	1	200	13	—	—
Bacterium Güntheri	1210	99	1300	81	80	21
Verflüssigende Kokken	4	—	—	—	—	—
Bacillus putrificus coli	—	—	—	—	1	—
Gesamtzahlen	1224	100	1600	100	381	100

Außer den hier angeführten Arten kam bei Probe I a auch das Oidium lactis in einer Menge von 2 Millionen kolonienbildender Zellen pro Kubikzentimeter vor.

Die Mikroflora der Milch ist hier durch die eingeimpften Arten nicht wesentlich beeinflußt worden. Nur das Bacterium Güntheri hat bei Probe M I a eine bedeutende Zunahme aufzuweisen. Das eingeimpfte Erdnußmaterial bewirkte, daß die genannte Art bei 37° C auf 99 Proz. heranwuchs, während sie in der entsprechenden Kontrollprobe nur 93 Proz. der gesamten Keimzahl erreicht. — Gerade umgekehrt verhalten sich in dieser Beziehung die bei 22° und 12° C aufgestellten Milchproben. Bei beiden Temperaturen ist die entsprechende Kontrollmilch ganz bedeutend reicher an Bacterium Güntheri. — Obwohl mit dem Impfmaterial das Bact. fluorescens nicht zugeführt wurde, trat diese Art, namentlich bei 12° C, stark hervor. Das Bact. Güntheri sank hier sogar auf 21 Proz. der Gesamtflora herunter, während es sich in der analogen, nicht geimpften Milch bei 55 Proz. zu halten vermochte. Dagegen sind in dieser Probe die Fluoreszierenden entsprechend in der Minderheit. — Der Bacillus putrificus coli konnte sich in der Milch mit ganz schwachem Säuregrad in bescheidener Menge entwickeln. — Ein kleiner Rest von verflüssigenden Kokken, der sich von der Konsummilch her noch hinüber gerettet hat, ist nach 24 Stunden knapp nachweisbar. Nach 2 Tagen jedoch sind alle Kokken gänzlich verschwunden.

Serie 6.

Einwirkung von Erdnußmehlprobe B, die 48 Stunden bei 37° C war, auf Konsummilch (vergl. p. 121).

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M IIa	M IIb	M IIc
Aufbewahrungstemperatur	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makrosk. Veränderung	18 Std.	$5^3/_4$ Tage	8 Tage
Makroskopisches Aussehen	gallertig geronnen, deutlich Gas	gallertig geronnen, schwach Gas	feinflockig geronnen
Geschmack	normal sauer	stark unrein sauer, bitter	kaum sauer, sehr stark bitter
Säuregrad	11,4 n/10 NaOH	14,7 n/10 NaOH	6,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IIa		M IIb		M IIc	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	—	—	8	1
Bacterium fluorescens	—	—	300	20	400	56
Bacterium acidi lactici	70	8	100	6	—	—
Bacterium Güntheri	800	92	1120	74	300	43
Gesamtzahlen	870	100	1520	100	708	100

Wie bei Serie 5 kam auch in vorstehender Serie das Oidium lactis vor, aber diesmal in der bei 22° C aufgestellten Probe; dieser Organismus fand sich in einer Zahl von 2 Millionen kolonienbildender Zellen pro Kubikzentimeter Milch. Wir ließen die Art in der Tabelle aber unberücksichtigt, weil sie sich bloß in einer relativen Zahl von ca. $^1/_8$ Proz. des gesamten Keimgehaltes vorfand.

Auch in vorstehender Serie wiederholt sich wieder das ganz gleiche Spiel der Auslese einzelner Arten, wie wir dies bisher ganz regelmäßig beobachten konnten. Makroskopisch ist eigentlich kein durchgreifender Unterschied zwischen den Kontrollproben und den geimpften Proben festzustellen. Nur ist bei der geimpften Milch M IIb bei 22° C gegenüber der korrespondierenden Kontrollprobe Kb die Gerinnung um $1^3/_4$ Tage früher erfolgt und in der letzteren hat auch eine bedeutend reinere Milchsäuregärung stattgefunden, da in der Kontrollmilch 89 Proz., in der Milch M IIb nur 74 Proz. der Gesamtflora an Bacterium Güntheri vorhanden sind. Dagegen ist das Bact. fluorescens in der Kontrollprobe nur mit 6 Proz., in der bei 22° C aufbewahrten Milch vorstehender Serie aber mit 20 Proz. vertreten. Auch die Gesamtkeimzahl in der geimpften Milch ist um 100 Millionen pro Kubikzentimeter größer.

Fast gar keine Abweichung läßt sich zwischen den beiden analogen Proben M IIa und der Kontrollmilch Ka bei 37° C feststellen. — In Probe M IIc tritt das Bacterium Güntheri zugunsten des Bacterium fluorescens etwas zurück. Dementsprechend ist auch der gefundene Säuregrad der Kontrollprobe ein bedeutend höherer als bei der geimpften Probe M IIc.

Serie 7.

Einwirkung von Erdnußmehl B, das angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war, auf Konsummilch (vergl. p. 121).

Die Herstellung und Verarbeitung der Milchproben, sowie die Untersuchung der aus diesen Proben angelegten Kulturen geschah wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M III a	M III b	M III c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	17½ Stunden	7 Tage	7¾ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	gallertig geronnen	gallertig geronnen	griesig-flockig geronnen
Geschmack	ziemlich rein sauer	sauer mit Stich ins Ranzig-bittere	säuerlich-bitter
Säuregrad	11,1 n/10 NaOH	15,1 n/10 NaOH	8,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M III a		M III b		M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	300	9	140	29
Bacterium coli	—	—	100	3	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	10	2	400	12	50	10
Bacterium Güntheri	550	96	2500	76	300	61
Verflüssigende Kokken . . .	10	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	570	100	3300	100	490	100

Auch in dieser Serie trat, wie in der vorhergehenden bei 22° C, Oidium lactis in untergeordneter Zahl auf. Die Probe M IIIa zeigt im Vergleich zur Kontrollprobe eine etwas frühere makroskopische Veränderung. Dagegen ist die Keimzahl bei der geimpften Milch bedeutend geringer, als bei der Kontrollmilch. — Auch in vorstehender Serie vermochten sich die Kokken nur bei 37° C während 24 Stunden zu halten. Das Bacterium acidi lactici tritt verhältnismäßig schwach auf, während das Bacterium Güntheri volle 96 Proz. der Flora beansprucht.

Am vielgestaltigsten ist die Mikroflora bei 22° C geblieben. Bacterium fluorescens tritt hervor; Bacterium Güntheri geht entsprechend zurück; die Gasbildner gewinnen an Bedeutung. Noch viel ausgesprochener als bei Probe M IIIb tritt das Bacterium fluorescens auf Kosten des Bacterium Güntheri in den Vordergrund bei der bei 12° C aufgestellten Probe M III c.

Serie 8.

Einwirkung von Erdnußmehl B, das 24 Stunden bei 22° C war, auf Konsummilch (Impfmaterial siehe Erdnußmehl II a, p. 122).

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M IV a	M IV b	M IV c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	16 Stunden	6½ Tage	7½ Tage
Makroskopisches Aussehen .	Blähung	gallertig geronnen, schwach Gas	grobflockig geronnen
Geschmack	säuerlich bis molkenartig	sauer u. bitter	stark ranzig und bitter
Säuregrad	10,2 n/10 NaOH	13,5 n/10 NaOH	8,7 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IV a		M IV b		M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	5	1	100	2	270	41
Bacterium acidi lactici . . .	100	12	300	6	40	6
Bacterium aërogenes	20	3	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	700	84	4500	92	350	53
Gesamtzahlen	825	100	4900	100	660	100

Das Impfmaterial beherbergte sechs verschiedene Bakterienarten, wovon das Bacterium Güntheri allein 70 Proz. in Anspruch nahm. In keiner der vorstehenden Proben waren nachweisbar: Das in karminroten Kolonien wachsende, unbekannte Stäbchen, der gelbe Gasbildner und die Kokken, ebenso fehlt Bacillus putrificus. Dagegen ist neu aufgetreten das Bacterium aërogenes, das aber in Probe M IVb und M IVc, also entweder infolge der langen Gärdauer der Milch oder wegen der niederen Temperatur der genannten Proben nicht mehr nachweisbar ist. Ganz ausnahmsweise setzt das Bacterium fluorescens in vorstehender Serie schon bei 37° C, wenn auch ganz schwach, ein. Bei der bei 22° C aufbewahrten Milch nimmt dieser Organismus bedeutend an Zahl zu, um bei 12° C nach 7½ Tagen einen Hauptbestandteil der Mikroflora auszumachen.

Wie in fast allen Serien ist auch hier die Bakterienzahl pro Kubikzentimeter bei 12° C etwas kleiner, als bei 37° C. Die maximale Keimzahl aber findet man stets bei 22° C. In keinem der bisherigen Fälle war die Keimzahl bei 37° C oder bei 12° C höher als bei 22° C. Das Bacterium Güntheri, das auch hier, wie überall den Hauptanteil an der Spaltpilzflora hat, ist diesmal bei der Milchprobe M IVa etwas hinter der normalen Vertretung zurückgeblieben; es steigt jedoch bei Probe M IVb wieder auf 92 Proz. In der bei 12° C aufbewahrten Milchprobe wird die genannte Art vom Bacterium fluorescens wie gewöhnlich stark zurückgedrängt.

Serie 9.

Einwirkung von Erdnußmehl B, das angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C war, auf Konsummilch (vergl. Erdnußmehl II b p. 122).

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M V a	M V b	M V c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	7 Tage	8 Tage
Makroskopisches Aussehen .	gleichmäßig gallertig geronnen, Gas	gallertig geronnen	flockig bis griesig geronnen
Geschmack	kratzend sauer	stark kratzend sauer, deutlich bitter	ranzig, stechend bitter
Säuregrad	12,8 n/10 NaOH	15,4 n/10 NaOH	7,5 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Was zunächst die Zeit bis zur makroskopischen Veränderung der Proben betrifft, so ist ein wesentlicher Unterschied zwischen den Kontrollmilchproben und den vorstehenden geimpften Proben nur bei der zu 22° C gestellten Milch festzustellen. Bei der Kontrollmilch war schon nach 4 Tagen

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	4	—	30	7
Bacterium acidi lactici . . .	140	15	130	12	130	29
Bacterium aërogenes	70	8	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	710	75	950	88	280	64
Verflüssigende Kokken . . .	17	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	937	100	1084	100	440	100

eine deutliche makroskopische Veränderung wahrzunehmen; bei der analogen Probe dieser Serie aber erst nach 7 Tagen. Trotzdem ist der Gesamtkeimgehalt der Kontrollmilch um 31 Proz. höher. Bei den Milchproben MV a und MV c bestehen weniger große Abweichungen, sowohl in Hinsicht auf die Zeit vom Ansetzen der Proben bis zu deren makroskopischen Veränderung, als auch in bezug auf den Gesamtkeimgehalt.

Bezüglich der Zusammensetzung der Mikroflora herrscht zwischen der Probe MV a und der Kontrollmilch K a eine ziemlich gute Übereinstimmung; ebenso bei den analogen Proben MV b und K b. Die Milch MV c dieser Serie dagegen ist viel ärmer an Bacterium fluorescens, als die korrespondierende Kontrollmilch K c. Dennoch muß gesagt werden, daß im allgemeinen die Abweichungen, die zwischen vorstehender Serie 9 und den Kontrollmilchproben bestehen, weit mehr in quantitativer als in qualitativer Hinsicht von Bedeutung sind.

Serie 10.

Einwirkung von Erdnußmehl B, das angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war, auf Konsummilch

(vergl. Erdnußmehl II c p. 122).

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M VI a	M VI b	M VI c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	7 Tage	8 Tage
Makroskopisches Aussehen .	gallertig bis flockig geronnen, deutlich Gas	typisch gallertig geronnen, schwach Gas	flockig-griesig geronnen
Geschmack	scharf sauer	sauer, sehr stark bitter	sehr scharf bitter
Säuregrad	14,2 n/10 NaOH	14,3 n/10 NaOH	4,0 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M VI a		M VI b		M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	20	2	180	35
Bacterium acidi lactici . . .	50	5	10	1	80	15
Bacterium aërogenes	20	2	110	9	—	—
Bacterium Güntheri	910	91	1000	88	260	50
Verflüssigende Kokken . . .	20	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1000	100	1140	100	520	100

Vor allem hervorzuheben ist hier der äußerst bittere Geschmack bei Probe M VIb und M VIc. Diese Erscheinung ist einer in obiger Serie besonders scharf zum Ausdruck gelangten Eigenschaft des Bacterium fluorescens zuzuschreiben. Aber auch die gasbildenden Milchsäurebakterien sind vermutlich an der Erzeugung dieses Bittergeschmacks beteiligt. — Was die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora obiger Serie betrifft, so bewegt sich diese wieder in den bisher gewohnten, normalen Grenzen. Bei 37° C macht sich ein Rest von verflüssigenden Kokken bemerkbar. Das Bacterium fluorescens ist hier nicht nachzuweisen, tritt aber mit abnehmender Temperatur wieder stark hervor, während das Bacterium Güntheri immer mehr zurückgeht. Bei 22° C zeigt sich wieder Oidium lactis.

C. Wirkung von Erdnußmehl B frisch und in verschiedenen Gärstadien auf sterile Milch.

Serie 11.

Wirkung von frischem Erdnußmehl auf sterile Milch.

Über die Herstellung der sterilen Milch siehe p. 13. Impfmenge wie früher, $^1/_{100}$ g pro 100 ccm Milch. Verfahren bei der Impfung und Untersuchung nach der im allgemeinen Teil p. 13ff. beschriebenen Methode.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S I	S II	S III
Gärtemperatur der Milch . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	4 Tage	5 Wochen
Makroskopisches Aussehen .	grobflockig-ziegerig geronnen, Gas	gallertig bis flockig geronnen	ganz feinflockig geronnen, fadenziehend
Geschmack	stark widerlich bitter, wenig sauer	unrein säuerlich	stark kratzend bitter
Säuregrad	9,4 n/10 NaOH	9,1 n/10 NaOH	8,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S I		S II		S III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	40	1	—	—
Bacterium fluorescens . . .	0,5	—	100	2	700	49
Bacterium putidum	—	—	—	—	200	14
Bacterium coli	5	1	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	230	36	800	16	15	1
Bacterium aërogenes	350	54	200	4	—	—
Bacterium Güntheri	60	9	3800	77	500	36
Bacterium herbicola aureum	—	—	—	—	6	—
Gesamtzahlen	645,5	100	4940	100	1421	100

Die Zusammenstellung der Mikroflora, die sich in der sterilen Milch aus den, durch eine kleine Menge frischen Erdnußmehles hineingebrachten Keimen entwickelte, zeigt uns auf den ersten Blick, daß sich die sterile Milch gegenüber der Einwirkung des Impfmaterials ganz anders verhält, als Konsummilch. Das war auch von vornherein anzunehmen.

Bezüglich der Zeitdauer von der Impfung der Probe bis zur makroskopisch wahrnehmbaren Veränderung ist festzustellen, daß sich die Probe S I ungefähr nach gleichem Zeitraum, Probe S II ziemlich viel früher, Probe S III aber mehr als viermal später veränderte, als die mit gleichem Material geimpfte Konsummilch. Die bezüglichen Zeiträume verhalten sich wie folgt (vergl. p. 124):

Gärtemperatur	Die makroskopische Veränderung trat ein bei: geimpfter Konsummilch nach	geimpfter steriler Milch nach	Zeitverhältnis
37° C	18 Stunden	18 Stunden	1 : 1
22° C	6 Tagen	4 Tagen	3 : 2
12° C	8 Tagen	5 Wochen	1 : $4^3/_8$.

Es scheint also, daß die „angestammte" Mikroflora der Konsummilch für eine frühere makroskopisch wahrnehmbare Veränderung bei höherer Temperatur weit weniger ausschlaggebend ist, als bei niederer. — Quantitativ bleibt die Probe S I dieser Serie um rund 600 Millionen pro Kubikzentimeter hinter der mit gleichem Material geimpften Konsummilchprobe zurück. In der bei 22° C aufgestellten Milch S II und der bei 12° C aufbewahrten Probe S III dagegen ist der Gesamtkeimgehalt um rund das doppelte größer, als bei der Milch M II und M III.

Durchgreifender noch als in quantitativer Hinsicht treten die Unterschiede in qualitativer Richtung hervor. In der geimpften Konsummilch hat das Bacterium Güntheri ganz regelmäßig das Übergewicht; in der vor der Impfung sterilisierten Milch jedoch treten, vor allem bei 37° C, die Gasbildner und da speziell das Bacterium aërogenes mächtig hervor. Bei 22° C kommt auch die Coli-aërogenes-Gruppe ganz bedeutend stärker zur Geltung als bei der Vergleichsprobe M II, während sich in der sterilen Milch die Fluoreszierenden in etwas schwächerem Verhältnis, wie in der analogen Konsummilch M III, entwickelten.

Serie 12.

Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl B, das angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war (vergl. Probe I a p. 121).

Herstellung und Untersuchung der Probe wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S I a	S I b	S I c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärzeit	24 Stunden	6 Tage	36 Tage
Makroskopisches Aussehen	gallertig geronnen, schwach Gas	feinflockig geronnen, wenig Gas	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	schwach säuerlich	unrein säuerlich	säuerlich-bitter
Säuregrad	10,5 n/10 NaOH	10,3 n/10 NaOH	4,4 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S I a absolut	S I a %	S I b absolut	S I b %	S I c absolut	S I c %
Bacterium fluorescens	—	—	—	—	530	36
Bacterium acidi lactici	10	1	30	2	110	7
Bacterium aërogenes	4	—	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	1020	99	1400	98	860	57
Gesamtzahlen	1034	100	1430	100	1500	100

Das Bild der Mikroflora dieser drei Milchproben entspricht im allgemeinen jenem des Impfmaterials. Besonders ist das der Fall bei Probe S I a und S I b; denn im Impfmaterial war das **Bacterium Güntheri** mit 99 Proz. der Keime vertreten; in obigen Proben nimmt diese Art 99 bzw. 98 Proz. ein. — Mehr abweichend verhält sich die Milch S I c. Hier vermochten die wenigen, ursprünglich im frischen Erdnußmehl vorhandenen, im Impfmaterial selbst aber nicht mehr nachweisbaren Keime von Bact. fluorescens, dank der sehr langen Gärzeit und der niederen Temperatur mit dem Bacterium Güntheri wirksam in Konkurrenz zu treten. — In vorstehender Serie ist nun einmal der Fall eingetreten, daß die Probe bei 12° C die höchste Bakterienzahl der Serie aufweist. Dieser Umstand erklärt sich ebenfalls aus der sehr langen Aufbewahrungszeit der geimpften Milch.

Serie 13.

Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl B, das angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war

(vergl. Erdnußmehl I b p. 121).

Herstellung der Proben, Impfmengen, Behandlung und Untersuchung der geimpften Proben wie bekannt.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S II a	S II b	S II c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärzeit	23 Stunden	6 Tage	4 Wochen
Makroskopisches Aussehen .	gallertig geronnen	leicht gallertig geronnen, schwach Gas	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	schwach säuerlich	säuerlich-bitter	widerlich sauer, ziemlich bitter
Säuregrad	10,7 n/10 NaOH	10,0 n/10 NaOH	4,3 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S II a		S II b		S II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium . . .	1	—	—	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	4	—	10	—	180	9
Bacterium putidum	—	—	—	—	50	2
Bacterium herbicola aureum	—	—	400	13	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	—	—	20	—	30	1
Bacterium aërogenes	—	—	100	3	4	—
Bacterium Güntheri	1550	100	2500	81	1900	88
Nicht verflüssigende Kokken	—	—	100	3	—	—
Gesamtzahlen	1555	100	3130	100	2164	100

Der Säuregrad geht mit sinkender Temperatur zurück. Sehr auffallend ist dieser Umstand bei Probe S II c. Hier hat das Bacterium Güntheri sein Säurebildungsvermögen beinahe verloren. Typisch ist dagegen das Bacterium fluorescens aufgetreten, den bekannten Bittergeschmack hervorrufend. Ausnahmsweise vermochte sich auch noch das Bacterium herbicola aureum bei 22° C zu halten. Im allgemeinen tritt die Gruppe der gasbildenden Milchsäurebakterien in vorstehender Serie stark zurück.

Serie 14.

Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl B, das angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war (vergl. Probe Ic p. 121.)

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S III a	S III b	S III c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	4 Tage	15 Tage
Makroskopisches Aussehen	gallertig geronnen	feinflockig bis gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	kaum säuerlich	schwach säuerlich-bitter	fade säuerlich, deutlich bitter
Säuregrad	8,4 n/10 NaOH	7,3 n/10 NaOH	3,7 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S III a		S III b		S III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium	1	—	—	—	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	300	5	850	16
Bacterium putidum	—	—	—	—	90	2
Bacterium acidi lactici	—	—	50	1	30	1
Bacterium Güntheri	6200	100	6000	94	4300	81
Verflüssigende Kokken	2	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	6203	100	6350	100	5270	100

Diese Serie stimmt mit der vorhergehenden darin überein, daß der Säuregrad der Proben mit abnehmender Gärtemperatur sinkt. Trotz der verhältnismäßig sehr niederen Säuregrade aller Proben finden wir dennoch das Bacterium Güntheri in weit überwiegender Mehrheit; in Probe S III a nimmt es sogar volle 100 Proz. ein. Wie früher, so vermag auch in vorstehender Serie das Bacterium fluorescens erst bei 22° C hervorzutreten. Bei 12° C nimmt diese Art wieder einen ansehnlichen Teil des Bakteriengehaltes ein. — Auffallend ist bei Serie 14 die große Menge der nachgewiesenen Spaltpilze. Von allen bisher untersuchten Milchproben der Versuchsreihe mit Erdnußmehl B finden sich hier die maximalen Keimzahlen.

Serie 15.

Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl B, das angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war (vergl. Erdnußmehl II a p. 122).

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S IV a	S IV b	S IV c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärzeit	16 Stunden	3 Tage	12 Tage
Makroskopisches Aussehen	kompakt ziegerig geronnen, viel Gas	grobflockig geronnen, schwach Gas	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	kratzend, unangenehm sauer	unrein säuerlich	fade säuerlich, schwach bitter
Säuregrad	10,8 n/10 NaOH	10,1 n/10 NaOH	2,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Bemerkenswert ist hier besonders die frühe makroskopische Veränderung der Proben dieser Serie. Von allen bisherigen Versuchen, wo es sich um die Einwirkung von Erdnußmehl B auf sterile Milch handelt, war weder bei 37° C, noch bei 22° und 12° C eine so rasche, makroskopisch wahrnehmbare Veränderung der Milch festzustellen. Es scheint also, daß das Erdnußmehl B, das 24 Stunden bei 22° C in Gärung war, die sterile Milch am raschesten zu verändern vermag.

Mikroskopischer Befund.

Bakterienart	S IV a		S IV b		S IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	20	1	900	74
Bacterium acidi lactici . . .	180	11	80	4	20	1
Bacterium aërogenes	40	3	30	2	—	—
Bacterium Güntheri	1370	86	1800	93	300	25
Gesamtzahlen	1590	100	1930	100	1220	100

Von den sechs im Impfmaterial nachgewiesenen Arten finden wir nur die zwei Arten von Milchsäurebakterien wieder. Das Bacterium fluorescens war im gärenden Erdnußmehl infolge zu geringer Zahl nicht nachzuweisen, findet sich aber in Probe S IVb schon in ansehnlicher Zahl und erlangt in der Milch bei 12° C, S IVc, mit 74 Proz. der Gesamtkeimzahl das entscheidende Übergewicht. Charakteristisch ist auch in dieser Serie, daß die Proben, trotz des relativ ganz bedeutenden Gehaltes an Bact. Güntheri, einen niederen Säuregrad aufweisen. In der mit dem gleichen Impfmaterial beschickten Konsummilch (siehe Serie 8) ist der Säuregrad bei der bei 22° C aufbewahrten Milch um ⅓, bei der bei 12° C aufbewahrten Probe sogar mehr als ums Doppelte höher. In den beiden Milchproben bei 37° C, M IVa und S IVa, bleibt sich der Säuregrad so ziemlich gleich; in der Milch S IV a ist er sogar noch um 0,6 Grade höher. Die Erscheinung weist darauf hin, daß das charakteristische Säureproduktionsvermögen des Bacterium Güntheri in steriler Milch mit abnehmender Temperatur mehr und mehr reduziert wird.

Serie 16.

Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl B, das angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C war (vergl. Erdnußmehl IIb, p. 122).

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S V a	S V b	S V c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	4 Tage	5 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	kompakt gallertig geronnen, bedeutend Gas	gallertig bis grobflockig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	kratzend säuerlich	unrein sauer, stark bitterer Nachgeschmack	säuerlich-bitter
Säuregrad	12,7 n/10 NaOH	10,5 n/10 NaOH	3,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

In der Regel wird die Milch bei 12° C erst nach 4—5 Wochen makroskopisch eine Veränderung erkennen lassen. In dieser Serie aber war die Probe S V c schon nach 5 Tagen deutlich verändert. Die Veränderung war also noch viel früher festzustellen, als bei der Probe S IV c der vorhergehenden Serie. Dieser relativ sehr raschen Veränderung entspricht auch der abnormal hohe Keimgehalt: 7240 Millionen pro Kubikzentimeter. Den überwiegenden Anteil

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S V a		S V b		S V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	3	—	10	—
Bacterium putidum	—	—	—	—	4400	60
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	50	4	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	130	10	300	22	30	1
Bacterium Güntheri	1140	88	1000	74	2800	39
Roter Sproßpilz	20	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1290	100	1353	100	7240	100

an der Mikroflora hat das Bacterium putidum. Es ist vermutlich aus dem im Impfmaterial nachgewiesenen Bacterium fluorescens hervorgegangen in der Weise, daß dieses letztere unter den besonderen Lebensbedingungen das Verflüssigungsvermögen von Eiweißstoffen spontan verloren hat. Ein ganz bescheidener Rest von Keimen hat diese Eigenschaft in sehr schwachem Grade noch beizubehalten vermocht.

Serie 17.

Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl B, das angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war (vergl. Erdnußmehl II c, p. 122.)

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S VI a	S VI b	S VI c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	4 Tage	4 Wochen
Makroskopisches Aussehen . .	kompakt gallertig geronnen; Gas	leicht gallertig bis grobflockig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	stark sauer und bitter	stark kratzend sauer	scharf stechend bitter, fauliger Geruch
Säuregrad	13,5 n/10 NaOH	13,0 n/10 NaOH	8,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S VI a		S VI b		S VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	4700	58
Bacterium putidum	—	—	—	—	1900	24
Bacterium coli	20	1	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	390	22	200	17	20	—
Bacterium aërogenes	50	3	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	1350	74	1000	83	500	6
Gelber Säurebildner	—	—	—	—	960	12
Gesamtzahlen	1810	100	1200	100	8080	100

Erwähnenswert ist vorerst die überraschend große Zahl von Fluoreszierenden in der bei 12° C aufgestellten Milch. Dann ist besonders auch die Reichhaltigkeit dieser Serie an Arten hervorzuheben. Es kommen 7 verschiedene Spezies vor, trotzdem im Impfmaterial nur 3 derselben, nämlich Bacterium acidi lactici, B. aërogenes und B. Güntheri nachgewiesen werden konnten. Wenn wir in Erwägung ziehen, daß in dem gleichen, aber 3 Tage jüngeren Impfmaterial auch Bacterium fluorescens und der gelbe Säurebildner in ansehnlicher Menge vorhanden waren, so läßt sich die Anwesenheit dieser Arten in obigen Proben wohl erklären. Die relativ geringe Zahl der Fluoreszenten, die das Impfmaterial barg, fand in der sterilen Milch ein Substrat, das gerade dieser Gruppe, besonders infolge der schwachen Vertretung von Säurebildnern, sehr gut zusagte. Daher diese abnorm hohen Zahlen.

Die gasbildenden Milchsäurebakterien haben, wie leicht verständlich, bei 37° C ihre maximale Entwicklung. Mit sinkender Temperatur sinkt auch ihre Zahl. — Daß auch in vorstehender Serie die fluoreszierenden Arten zur Ursache eines intensiven Bittergeschmackes geworden sind, beweist die in der makroskopischen Vorprüfung durchgeführte Geschmacksprobe.

D. Zusammenstellung der Hauptergebnisse.

a) Die Flora des Impfmaterials.

Bezeichnung der Proben	Zeit und Temperatur der Gärung		Gesamtkeimzahl in Millionen	Vermehrungsquotient, auf die urspr. Keimzahl bezogen	Hauptvertreter in %		
	Tage	Grade C			Bact. Güntheri	Coli-aërog.-Gruppe	Peptonisierende
Erdnußmehl B							
Frisches Material . .	—	—	0,585	—	—	6	18
Serie 1							
Erdnußmehl I a . . .	1	37	66 494	113 665	99	+1)	—
„ I b . . .	2	37	3 172	5 422	95	4	—
„ I c . . .	5	37	1 389	2 374	93	4	3
Serie 2							
Erdnußmehl II a . .	1	22	5 700	9 743	70	5	+
„ II b . .	2	22	3 118	5 329	96	+	2
„ II c . .	5	22	1 080	1 846	72	28	—

b) Gesamtkeimzahlen der geimpften Milchproben.

No. der Serie	Art der Milchprobe	Gesamtzahl der Keime pro ccm in Millionen bei einer Aufbewahrungstemperatur von		
		37° C	22° C	12° C
3	Kontrollmilchproben	872	1420	640
4	Milch + frisches Erdnußmehl B	1245	2210	680
5	Milch + Gärmaterial, das bei 37° C war . .	1224	1600	381
6		870	1520	708
7		570	3300	490
8	Milch + Gärmaterial, das bei 22° C war . .	825	4900	660
9		937	1084	440
10		1000	1140	520
11	Sterile Milch + frisches Erdnußmehl A . .	645,5	4940	1421
12	Sterile Milch + Gärmaterial, das bei 37° C war	1034	1430	1500
13		1555	3130	2164
14		6203	6350	5270
15	Sterile Milch + Gärmaterial, das bei 22° C war	1590	1930	1220
16		1290	1353	7240
17		1810	1200	8080

---

1) + bedeutet: Vorhanden, aber prozentuell nicht faßbar.

c) Die wichtigsten Bakterienarten in %.

Art der Milchprobe	No. der Serie	Mikroflora bei 37° C					Mikroflora bei 22° C					Mikroflora bei 12° C				
		Fluoreszenten	B. acidi lactici u. B. coli	B. aërogenes	B. Güntheri	Andere Arten	Fluoreszenten	B. acidi lactici u. B. coli	B. aërogenes	B. Güntheri	Andere Arten	Fluoreszenten	B. acidi lactici u. B. coli	B. aërogenes	B. Güntheri	Andere Arten
1. Kontrollmilchproben	3	—	7	—	93	+	6	5	—	89	—	39	3	—	55	3
2. Konsummilch geimpft mit:																
Erdnußmehl B frisch	4	—	1	—	98	1	35	9	—	51	5	73	12	—	15	—
„ 24 Std. bei 37° C	5	—	1	—	99	+	6	13	—	81	—	79	—	—	21	+
„ 48 „ „ 37° C	6	—	8	—	92	—	20	6	—	74	—	56	—	—	43	1
„ 5 Tage „ 37° C	7	—	2	—	96	2	9	15	—	76	—	29	10	—	61	—
„ 24 Std. „ 22° C	8	1	12	3	84	—	2	6	—	92	—	41	6	—	53	—
„ 48 „ „ 22° C	9	—	15	8	75	2	+	12	—	88	—	7	29	—	64	—
„ 5 Tage „ 22° C	10	—	5	2	91	2	2	1	9	88	—	35	15	—	50	—
3. Sterile Milch geimpft mit:																
Erdnußmehl B frisch	11	+	37	54	9	—	2	16	4	77	1	63	1	—	36	+
„ 24 Std. bei 37° C	12	—	1	+	99	—	—	2	—	98	—	36	7	—	57	—
„ 48 „ „ 37° C	13	+	—	—	100	+	+	+	3	81	16	11	1	+	88	—
„ 5 Tage „ 37° C	14	—	—	—	100	+	5	1	—	94	—	18	1	—	81	—
„ 24 Std. „ 22° C	15	—	11	3	86	—	1	4	2	93	—	74	1	—	25	—
„ 48 „ „ 22° C	16	—	10	—	88	2	+	22	—	74	4	60	1	—	39	—
„ 5 Tage „ 22° C	17	—	23	3	74	—	—	17	—	83	—	82	+	—	6	12

Aus der mit Erdnußmehlprobe B durchgeführten Versuchsreihe heben wir folgende Hauptresultate hervor:

a) In bezug auf den Verlauf der Gärung: Im angefeuchteten Erdnußmehl setzt die Gärung bei 37° C sehr intensiv ein, hat aber nach 24 Stunden schon den Höhepunkt überschritten und nimmt von da an vorerst rasch, dann langsamer ab. Bei 22° C ist der Gärungsverlauf in allen Teilen ruhiger. Das entscheidende Übergewicht von den im gärenden Erdnußmehl auftretenden Bakterienarten hat unter allen Umständen das Bacterium Güntheri.

b) In bezug auf die Einwirkung von Erdnußmehl B auf Konsummilch. Durchgreifende Unterschiede zwischen den geimpften und nicht geimpften Proben lassen sich in Rücksicht auf die makroskopische Veränderung im allgemeinen nicht stets feststellen. In den einzelnen Serien aber treten oft wesentliche Abweichungen zutage. So zeigen einige bei 37° C aufgestellte, geimpfte Proben eine um 1—2 Stunden frühere makroskopisch wahrnehmbare Veränderung, als die bezüglichen Kontrollproben. Bei jenen Proben, die mit Gärmaterial, das angefeuchtet 24 oder 48 Stunden bei 22° C aufgestellt war, geimpft wurden, ist äußerlich schon eine stark vermehrte Gasbildung wahrzunehmen.

Frisches Erdnußmehl kann, in kleinen Mengen in frische Konsummilch gebracht, die Haltbarkeit dieser Milch nicht erheblich beeinflussen. Doch ist die Bakterienzahl eine etwas höhere. — In den Kontrollmilchproben, wie in den geimpften Milchproben, finden sich die maximalen Keimzahlen fast stets bei einer Aufbewahrungstemperatur von 22° C; die minimalen immer bei 12° C. Die Proben bei 37° C halten bei allen Serien jeweils die Mitte ein.

c) Die Einwirkung von Erdnußmehl auf sterile Milch. Eine makroskopisch wahrnehmbare Veränderung der geimpften

Proben von steriler Milch erfolgt nur dann ebenso schnell wie bei den analogen Proben von gewöhnlicher Konsummilch, wenn die Proben bei 37° C aufbewahrt werden. Impfmaterial, herrührend von der frischen Erdnußmehlprobe B, bewirkte bei dieser Temperatur eine äußerst starke Blähung. — Bei 22° und namentlich bei 12° C erfolgt die makroskopische Veränderung in der Regel viel später als bei den entsprechenden Konsummilchproben. Diese Erscheinung wird wohl dem Umstande zuzuschreiben sein, daß das Bact. Güntheri, das auch in der als Nährflüssigkeit benützten sterilen Milch bis zu der Temperatur von 12° C herab das Hauptkontingent der Mikroflora stellte, in der Regel sich nicht so üppig entwickelte, als in der Konsummilch. In steriler Milch zeigt Bacterium Güntheri vor allem auch ein bedeutend geschwächtes Säurebildungsvermögen. Fast ausnahmslos ist der Säuregrad der mit steriler Milch angesetzten Proben, trotz der ganz bedeutend längeren Gärdauer, wesentlich niederer. Die bezüglichen Zahlen im Durchschnitt aller vergleichbaren Proben betragen bei:

Aufbewahrungstemperatur	Geimpfter Konsummilch	Geimpfter steriler Milch	Der Säuregrad der Konsummilch ist höher um %
37° C	12,19 n/10 NaOH	10,86 n/10 NaOH	12
22° C	14,89 „	10,04 „	48
12° C	6,36 „	5,13 „	24

Im Gegensatz zu Bacterium Güntheri nehmen bei 12° C die Fluoreszierenden sehr stark an Bedeutung zu. Bei 37° C hingegen vermag sich diese Gruppe nur ganz ausnahmsweise und immer in ganz bescheidener Menge jeweils einzig dann, wenn das geimpfte Substrat nicht mehr als 24 Stunden alt war, noch lebenskräftig zu erhalten. — Es mag hier auch erwähnt werden, daß sterile Milch voraussichtlich gut geeignet ist, den sprungweisen Übergang von Bacterium fluorescens in Bacterium putidum zu ermöglichen, resp. daß Bact. fluorescens hier leicht sein Peptonisierungsvermögen einbüßt. — Endlich hat vorstehende Versuchsreihe die schon früher gemachte Erfahrung aufs neue bestätigt, daß durch Bact. fluorescens die Milch einen mehr oder weniger bitteren Geschmack annehmen kann.

Verflüssigende Kokken treten nur nach kurzer Gärdauer in der Milch auf und fast einzig nur in den bei 37° C aufgestellten Proben. In älteren Milchproben vermögen sie sich niemals entwicklungsfähig zu erhalten.

6. Erdnußmehlprobe C.

Diese Probe wurde am 4. Dezember 1909 von der agrikulturchemischen Untersuchungsanstalt in Zürich abgeholt. Sis stammte aus einer Ölfabrik in Marseille, wo importierte Erdnüsse verarbeitet werden. Das makroskopische Aussehen war normal. Die Probe wurde bis zur Verarbeitung in sterilisiertem Glaskolben, mit einem sauberen Kork lose verschlossen, aufbewahrt. Am 29. Januar 1910 wurde sie auf die übliche Art und Weise verarbeitet.

a) Erdnußmehl C frisch.

Hinsichtlich der Untersuchungsergebnisse siehe folgende Seite.

In dieser Probe sind nicht weniger als 16 verschiedene Spaltpilzarten vorhanden; es ist also eine sehr kompliziert zusammengesetzte Mikroflora. Mit ziemlicher Sicherheit läßt sich jedoch annehmen, daß durch ein geeignetes Anreicherungsverfahren und eine noch ausgedehntere Untersuchungsweise eine ganze Zahl weiterer Spezies isoliert werden könnten. Zur Möglichkeit eines Nachweises mußte in vorstehender Probe jede Art mindestens in einer Zahl von 1000 lebenskräftigen Keimen vorhanden sein.

Untersuchungsresultate (Zahlen pro g).

Bakterienart	Keimzahl absolut	Keimzahl in %
Bakterium fluorescens	2 000	1
Bacillus tumescens	30 000	10
Bacillus mesentericus	20 000	7
Bacillus subtilis	15 000	5
Bacillus megatherium	1 000	—
Kleine verflüssigende **Kokken, weiß**	10 000	3
Große verflüssigende **Kokken, weiß**	10 000	3
Kokken in rötlichen Kolonien	6 000	2
Gelber Diplococcus	5 000	2
Gelber Gasbildner	3 000	1
Bacterium acidi lactici	30 000	10
Bacterium aërogenes	10 000	3
Streptothrix weiß (alba)	120 000	39
Streptothrix chromogena	30 000	10
Sporenloses, unbek. Kurzstäbchen in rötlichen Kolonien	6 000	2
Bacillus putrificus coli	4 000	2
Gesamtzahl	302 000	100

Weitaus den größten Prozentsatz nimmt in dieser Serie eine bis dahin noch sehr wenig aufgetretene weiße Streptothrichae ein. Wir werden diesem Organismus später noch öfter begegnen. — Verflüssigende Arten sind 8 vorhanden, die zusammen 31 Proz. der gesamten Keimzahl ausmachen. — Woher nun alle diese Arten stammen, ob sie schon ursprünglich, zum Teil wenigstens, an den Erdnüssen vorhanden waren, oder aber erst im Verlaufe der nachherigen Behandlung, Verarbeitung und Aufbewahrung hineingekommen sind, entzieht sich unserer Kontrolle. Doch spricht die Anwesenheit von Bacillus putrificus coli sehr dafür, daß das Erdnußmehl, trotz seines sonst tadellosen makroskopischen Aussehens, doch früher einmal einen Fäulnisprozeß durchgemacht hat. Trotz der großen Zahl von Arten beläuft sich der Gesamtkeimgehalt doch nur auf 302 000 pro Gramm. — Aus den folgenden Versuchen werden wir erfahren, wie sich die Mikroflora des Gärmaterials im Verlaufe der Gärzeit ändert.

b) Untersuchung der frischen Milch und der Kontrollmilchproben.

Die frische Konsummilch.

Die Milch wurde am 29. Januar 1910 im Verkaufslokale Sch. in Zürich IV abgeholt und für alle nachfolgenden Versuche mit Erdnußmehl C verwendet. Die Milch war nicht mehr ganz frisch, entsprach jedoch noch ziemlich den Anforderungen, die man an eine gewöhnliche Marktmilch stellt. Sie wurde zwecks bakteriologischer Analyse sofort verarbeitet.

Diese Konsummilch erweist sich als außerordentlich keimreich. Der Keimgehalt übertrifft jenen der früher untersuchten Frischmilchproben, die vom „Strickhof“ sofort nach dem Melken abgeholt wurden, um das 15- bis 88-fache. Eine sehr große Bakterienzahl ließ sich von einer gewöhnlichen Marktmilch auch zum vorhinein erwarten. — Von den 7 in dieser Milch vorkommenden Spaltpilzarten hat bereits das Bacterium Güntheri das entscheidende Übergewicht erlangt. Aber auch die Gasbildner sind in recht bedeutender Zahl vorhanden; die Kokken haben sich relativ gut behauptet.

Bakteriologischer Befund (pro ccm Milch).

Bacterium fluorescens	60 000	=	2 %
Bacillus mesentericus	10 000	=	—
Gelber Säurebildner	60 000	=	2 %
Bacterium coli	20 000	=	—
Bacterium acidi lactici	800 000	=	18 %
Bacterium Güntheri	1 800 000	=	41 %
Kokken	1 600 000	=	37 %
Gesamtzahl	4 350 000	=	100 %

Die Kontrollproben.

Diese wurden von der oben besprochenen Marktmilch auf die gewohnte Weise hergestellt und bei den 3 üblichen Temperaturen, 37° C, 22° C und 12° C aufbewahrt. Nach Eintritt der makroskopisch wahrnehmbaren Veränderung fand die Untersuchung statt.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	K a	K b	K c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	40 Stunden	5 Tage
Makroskopisches Aussehen	feinflockig bis ziegerig geronnen, Blähung	gleichmäßig gallertig geronnen	schwach gallertig geronnen
Geschmack	ziemlich normal	sauer, etwas bitter	stark sauer, mit bitterm Nachgeschmack
Säuregrad	10,1 n/10 NaOH	14,1 n/10 NaOH	17,4 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	K a		K b		K c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	650	33	240	30
Bacterium putidum	—	—	80	4	50	6
Bacterium acidi lactici	80	9	50	2	20	3
Bacterium aërogenes	100	12	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	660	78	1200	61	480	61
Verflüssigende Kokken	7	1	—	—	—	—
Gesamtzahlen	847	100	1980	100	790	100

Die Bakterienflora zeigt gegenüber jener der frischen Milch ein wesentlich verändertes Bild. Bei 37° C hat sich unter gleichzeitiger Hintanhaltung der Kokken eine beinahe ausschließliche Milchsäuregärung herausgebildet. Die Gasbildner haben sich sehr stark vermehrt; dagegen ist das Bacterium Güntheri, im Gegensatz zu seinem Verhalten bei den früheren Kontrollmilchproben, verhältnismäßig stark im Rückstand geblieben. — Bei 22° C und 12° C sind die Kokken ganz verschwunden. Das Bacterium Güntheri ist hier prozentuell noch mehr zurückgetreten als bei 37° C. Dagegen haben die Fluoreszenten stark zugenommen. Die Gasbildner haben sich zwar bei allen 3 Kontrollproben, gegenüber ihrer Zahl in der Frischmilch, ansehnlich vermehrt; relativ aber sind sie in den Kontrollmilchproben K b und K c stark im Rückstand geblieben.

c) Erdnußmehl C in gärendem Zustande.

Am 28. Januar 1910 wurde je eine Probe des Erdnußmehles C in der üblichen Menge von 40 g steril abgewogen und angefeuchtet zu 37° bzw. 22° C verbracht. Diese Proben wurden nach 24 resp. 48 Stunden untersucht.

Makroskopisches Aussehen: Probe bei 37° C nach 24 Stunden = Probe I a; deutliche Gasbildung wahrnehmbar, Geruch der Probe säuerlich, nach Faßzieger, Farbe noch normal.

Probe bei 22° C nach 48 Stunden = Probe II b; Schwache Blähung, Geruch wie bei Probe I a, schwacher Anflug eines weißen Mycelpilzes.

Anlegen der Kulturen und Untersuchung derselben wie üblich.

Mikroskopischer Befund.
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenen Materials berechnet.)

Bakterienart	Probe I a		Probe II b	
	absolut	%	absolut	%
Bacterium coli	—	—	2	—
Bacterium acidi lactici	50	1	50	1
Bacterium Güntheri	5000	82	8300	99
Gelber Gasbildner	—	—	2	—
Bacillus putrificus coli	1000	16	—	—
Actinomyces thermophiles Gilbert	50	1	—	—
Gesamtzahlen	6100	100	8354	100

In beiden Proben hat wieder das Bacterium Güntheri die Oberhand. Von den 16 im frischen Material nachgewiesenen Arten sind nur noch 4 vorhanden; die anderen 12 sind innerhalb der relativ kurzen Gärdauer spurlos verschwunden. Zugrunde gegangen, bzw. nicht mehr in einer für den Nachweis genügend großen Zahl vorhanden, sind die Kokkenarten, die Fluoreszierenden und alle aëroben Peptonisierenden. Auch in vorstehendem Untersuchungsmaterial sind es wieder die Milchsäurebakterien, die schließlich das Feld behaupten. — Sehr überraschend ist die starke Entwicklung von Bacillus putrificus coli. Diese Art nimmt nach 24-stündiger Gärung bei 37° C die bedenklich hohe Zahl von 1000 Millionen Keimen pro Gramm ein; das macht 16 Proz. der gesamten Keimzahl aus. Bei 22° dagegen ist nach 48 Stunden keine Spur von diesem Fäulniserreger zu entdecken. Die rasch und energisch überhand nehmende Milchsäuregärung dürfte die Ursache dieser Erscheinung sein.

d) Konsummilch, geimpft mit frischem Erdnußmehl C.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Milchproben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M I	M II	M III
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	40 Stunden	56 Stunden
Makroskopisches Aussehen	typisch käsig-ziegerig geronnen	gleichmäßig gallertig geronnen	gallertig geronnen
Geschmack	ziemlich rein sauer	stark sauer mit bitterem Nachgeschmack	sauer, ranzig-bitter
Säuregrad	10,7 n/10 NaOH	16,0 n/10 NaOH	16,3 n/10 NaOH

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I		M II		M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	200	14	380	14
Bacterium putidum	—	—	—	—	50	2
Bacterium acidi lactici	280	36	—	—	70	2
Bacterium aërogenes	77	9	—	—	20	1
Bacterium Güntheri	420	51	1200	85	2200	81
Weiße Streptothrichae	7	1	—	—	—	—
Actinomyces, gelblich	—	—	6	1	—	—
Verflüssigende Kokken	30	3	2	—	—	—
Gesamtzahlen	814	100	1408	100	2720	100

Außer den hier genannten 8 Arten fand sich bei 22° C noch der schon früher in den Kontrollproben bei der genannten Temperatur aufgetretene Sproßpilz in einer Zahl von ca. 1 Million pro Kubikzentimeter Milch vor.

Die Wirkung der Impfung von Konsummilch mit frischem Erdnußmehl C zeigt sich in vorstehendem Versuch etwas deutlicher in qualitativer als in quantitativer Hinsicht. — Was zunächst die Gärdauer, d. h. die Zeit vom Ansetzen der Proben bis zu deren makroskopisch wahrnehmbaren Veränderung betrifft, so ist bei den zu 37° und 22° C verbrachten Proben kein Unterschied wahrzunehmen; bei Probe M III dagegen erscheint die Gärdauer gegenüber der Kontrollmilch um mehr als die Hälfte verkürzt.

Die Gesamtkeimzahl ist bei den Proben M I und M II durch die Impfung nicht wesentlich beeinflußt worden, wenigstens nicht im Sinne einer Steigerung des Keimgehaltes. Bei Milch M II erscheint der Bakteriengehalt sogar geringer als bei der analogen, nicht geimpften Probe K b. Dies ist eine Erscheinung, die wir schon früher beobachten konnten und die wir wohl beim Einimpfen gärenden, bakterienreichen Materials am zutreffendsten als Ausdruck des „Kampfes", der zwischen den neu eingeimpften Arten einerseits und der in der Milch schon ansässigen Mikroflora anderseits stattfindet, bezeichnen könnten. Im vorliegenden Falle dürfte die Erklärung darin liegen, daß pro Kubikzentimeter Milch nur eine sehr bescheidene Menge von Keimen (ca. 30) durch Impfung zugefügt wurden, was für die an und für sich bakterienreiche Milch ohne Bedeutung ist. In der bei 12° C gestandenen geimpften Milch M III ist die Keimzahl, verglichen mit der Kontrollmilch K c, um rund 2000 Millionen pro Kubikzentimeter größer.

Die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora der geimpften Milchproben hat gegenüber den nicht geimpften Proben insofern eine Verschiebung erfahren, als durch die Impfung in der Milch bei 37° C die Gasbildner, in jener bei 22° C aber das Bacterium Güntheri in der relativen Vertretung gefördert wurden. Größer aber als bei den eben genannten Temperaturen ist die Wirkung der Impfung in der bei 12° C aufgestellten Probe. Diese Wirkung äußert sich nicht nur in der viel früheren makroskopischen Veränderung der Milch, also in der Verkürzung der Haltkarkeit derselben, sondern auch im schon oben erwähnten stark vermehrten Bakteriengehalt. Auch hier stellt das Bacterium Güntheri wieder das Hauptkontingent. Die Fluoreszenten haben sich in dieser Probe verhältnismäßig nur bescheiden entwickelt.

e) Konsummilch, geimpft mit gärendem Erdnußmehl.

Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl C, das angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war. (Vergl. Probe I a, p. 141).

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben nach bekannter Methode.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M I a	M I b	M I c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	15 Stunden	36 Stunden	5¼ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	feinflockig bis ziegerig geronnen, Gas	gleichmäßig gallertig geronnen	gallertig geronnen
Geschmack	molkenartig	rein sauer	stark sauer, deutlich bitter
Säuregrad	11,3 n/10 NaOH	15,1 n/10 NaOH	16,5 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus und Bacillus subtilis	—	—	—	—	710	50
Bacterium fluorescens . . .	—	—	140	12	130	9
Bacterium putidum	—	—	70	6	—	—
Bacterium coli	4	1	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	50	7	20	1	20	1
Bacterium aërogenes	9	2	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	600	90	990	81	560	40
Gesamtzahlen	663	100	1220	100	1420	100

Bei 12° C kam neben den genannten Arten noch ein Sproßpilz in untergeordneter Menge zum Vorschein. Auffallend ist bei 12° C besonders das sehr starke Auftreten von Bacillus mesenterius und Bacillus subtilis, die hier in bedeutender Variation auftreten. Die Arten stammen vermutlich aus dem Impfmaterial und haben sich in der ersten Zeit der Gärung während des noch sehr niederen Säuregrades der Milch, voraussichtlich einer außergewöhnlichen Entwicklung erfreut.

Im allgemeinen steht der Keimgehalt der Proben dieser Serie dem Keimgehalt der Kontrollmilchproben etwas nach; nur die Probe M I c macht eine Ausnahme. Auch die in beiden Vergleichsserien vorkommenden Bakterienarten stimmen — mit Ausnahme der bei Probe M I c schon erwähnten „Heu- und Kartoffelbazillen“ — ziemlich überein. Bemerkenswert ist das Nichtvermehren des Bacillus putrificus, der mit dem Impfmaterial in die Milch gelangte.

Konsummilch, geimpft mit Erdnußmehl C, das angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C war. (Vergl. Erdnußmehlprobe II b, p. 141).

Hinsichtlich Vorprüfung und mikroskopischem Befund siehe folgende Seite.

Außer den genannten 6 Arten fand sich in der Milch V b auch Oidium lactis in untergeordneter Zahl; ferner ließen sich in V b und namentlich auch in V c Sproßpilze nachweisen, die wir nicht weiter verfolgten.

In bezug auf die Gärdauer der Proben dieser Serie läßt sich zwischen diesen und den Kontrollproben kein wesentlicher Unterschied feststellen.

Die makroskopische Veränderung der geimpften und nicht geimpften Proben trat bei 37° C gleichzeitig ein; bei 22° C war die geimpfte Milch zwar ca. 2 Stunden früher geronnen; bei 12° C dagegen zeigte die nicht geimpfte Probe eine um 5—6 Stunden früher wahrnehmbare makroskopische Veränderung. Hinsichtlich des Gesamtkeimgehaltes wiesen die geimpften Proben M V a und M V b einen kleineren Bakteriengehalt auf als die bezüglichen ungeimpften Proben; bei Probe M V c dagegen ist es umgekehrt.

Vorprüfung.

Bezeichnung der Probe	M V a	M V b	M V c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	38 Stunden	5¼ Tage
Makroskopisches Aussehen	gebläht, käsig-ziegerig geronnen	gallertig geronnen, schwache Gasbildung	gallertig geronnen
Geschmack	stark sauer	normal sauer	stark sauer und bitter
Säuregrad	11,7 n/10 NaOH	14,1 n/10 NaOH	16,2 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	10	1	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	450	30	20	2
Bacterium putidum	—	—	70	5	—	—
Bacterium acidi lactici	25	5	100	7	90	9
Bacterium aërogenes	50	12	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	350	82	650	44	810	88
Verflüssigende Kokken	6	1	—	—	4	1
Bacillus putrificus coli	—	—	200	13	—	—
Gesamtzahlen	431	100	1480	100	924	100

Etwas deutlicher treten die Unterschiede bezüglich der Mikroflora in qualitativer Beziehung zutage; aber auch hier nicht bei allen Proben. Bei 37° C decken sich die Untersuchungsergebnisse zwischen der geimpften und nicht geimpften Probe fast vollständig. Bei 22° C tritt in der geimpften Probe der Bacillus putrificus in der sehr bedeutenden Menge von 13 Proz. auf, obwohl er im eingeimpften Material nicht nachweisbar war. Dadurch sinkt das Bacterium Güntheri etwas in seiner relativen Vertretung. In der Kontrollmilch bei 12° C nimmt das Bacterium fluorescens einen größeren Prozentsatz ein als in der geimpften Probe; dagegen erlangt das Bacterium Güntheri einen Vorsprung. Die Ursache dieser Erscheinung dürfte in der Einwirkung des an Bacterium Güntheri reichen Impfmaterials zu suchen sein.

Ein Überblick über die gesamten Untersuchungsergebnisse der Erdnußmehlprobe C zeigt uns, daß bald die nicht geimpften Kontrollmilchproben, bald die mit Erdnußmehl geimpften Proben eine kürzere Haltbarkeit und eine vermehrte Bakterienzahl aufweisen und daß also eine allgemeine und durchgreifende Einwirkung durch die Impfung im Sinne einer starken Herabsetzung der Milchqualität nicht festgestellt werden kann. Die allgemeine Schlußfolgerung geht deshalb dahin, daß eine Impfung oder Verunreinigung mit kleinen Mengen frischen oder gärenden Erdnußmehles in bezug auf Haltbarkeit, Zahl und Arten der Bakterien einer schon keimreichen, gewöhnlichen Marktmilch nicht von bestimmendem und allgemeinem Einfluß ist.

7. Erdnußmehlprobe D.

a) Erdnußmehl D, frisch.

Die Probe wurde am 27. Januar 1910 durch Vermittlung von Herrn B. aus Sissach, Baselland, bezogen. Sie war bezeichnet als „Marke Schaf“. Aussehen normal. Verarbeitung am 28. Januar 1910 wie üblich auf gewöhnliche Gelatineplatten, Milchzuckeragarplatten und Milchzuckeragar hohe Schichtkultur.

Die Untersuchung der Kulturen am 9. Februar 1910 ergab folgende Resultate:

Erdnußmehl D, frisch.

Bakterienart	Zahl absolut pro g	%
Bacillus megatherium	30 000 =	5 %
Bacillus mesentericus	40 000 =	6 %
Bacillus subtilis	100 000 =	16 %
Bacillus tumescens	20 000 =	3 %
Bacterium fluorescens	30 000 =	5 %
Bacterium putidum	20 000 =	3 %
Bacterium Zopfii	20 000 =	3 %
Bacterium coli	10 000 =	2 %
Bacterium acidi lactici	20 000 =	3 %
Bacterium aërogenes	10 000 =	2 %
Dickes Stäbchen in rötlichen Kolonien	20 000 =	3 %
Gelber Gasbildner	40 000 =	6 %
Gelber Säurebildner	10 000 =	2 %
Weiße Streptothrix	1 000 =	— %
Große Kokken in rötlichen Kolonien	20 000 =	3 %
Weiße Kokken	30 000 =	5 %
Bacillus putrificus coli	200 000 =	33 %
Gesamtzahl	621 000 =	100 %

Trotzdem die Gesamtkeimzahl dieser Probe eine nicht hohe genannt werden darf, ist doch die Mikroflora recht mannigfaltig, und es würden sich ohne Zweifel bei einem geeigneten Spezialverfahren noch weitere Arten isolieren lassen, die wegen zu bescheidener Anzahl unter der starken Konkurrenz gar nicht aufkamen. Stark vertreten sind die Peptonisierenden, besonders Bacillus subtilis und B. mesentericus. Bedenklich erscheint jedoch unbedingt das ganz abnormal starke Auftreten des Bacillus putrificus coli, da dieser Fäulniserreger mit 33 Proz. der gesamten Keimzahl hier an erster Stelle steht. Es erscheint gewagt, ein solches Futtermittel an landwirtschaftliche Nutztiere zu verfüttern. Doch ist es leicht möglich, daß durch Zufall ein besonders starker Herd von B. putrificus in das 2 g betragende Untersuchungsmaterial gelangte. Der Umstand aber, daß in Probe D dieser Spaltpilz in so reichlichem Maße sich vorfand, spricht dennoch recht deutlich dafür, daß selbst in einem ganz normal aussehenden Futtermittel große Mengen verdächtiger Pilze enthalten sein können.

b) Gärendes Material D.

Zwei Proben zu je 40 g wurden in üblicher Weise in sterile Gläser abgewogen und mit sterilem Wasser angefeuchtet. Die eine Probe kam ein Tag zu 22° C, die andere 2 Tage zu 37° C.

Bezeichnung der Proben: Probe angefeuchtet 2 Tg. bei 37° C = I b
„ „ 1 Tg. „ 22° C = II a

Makroskopisches Aussehen:

Probe Ib: Wenige Stunden nachdem die Probe zu 37° C gestellt wurde, trat starke Gasbildung ein. Diese ging aber rasch wieder zurück. Nach 48 Stunden war die Oberfläche des Gärmaterials, wie dies bei früheren Proben ziemlich regelmäßig der Fall war, schwach rötlich-violett verfärbt. Es scheint, daß sich dieser Farbstoff nur bei Luftzutritt bildet, denn im Innern der Probe war nie eine Verfärbung wahrzunehmen. Der Geruch der Probe war schwach sauer und etwas faulig.

Probe IIa: Nach 12 Stunden war eine schwache Blähung wahrnehmbar, die aber nach Verlauf von 24 Stunden ganz verschwunden war. Die Farbe der Probe war noch unverändert; es machte sich eine ganz schwache Säuerung bemerkbar. Von den beiden Proben I b und II a wurden Kulturen angelegt und mit dem Material zugleich je 3 Proben sterilisierter Milch beschickt.

Mikroskopischer Befund des gärenden Materials (Zahlen in Millionen pro g lufttrockenen Materiales berechnet).

Bakterienart	Probe I b		Probe II a	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	60	1
Bacillus subtilis	—	—	40	—
Bacterium fluorescens	1	—	100	1
Gelber Gasbildner	30	7	1000	10
Gelber Säurebildner	—	—	100	1
Bacterium acidi lactici . . .	40	10	500	5
Bacterium aërogenes	—	—	1000	10
Bacterium Güntheri	310	72	7000	72
Kokken	50	11	—	—
Gesamtzahlen .	431	100	9800	100

Außer den in vorstehender Tabelle angeführten Arten war in der Probe II a auch der Bacillus putrificus in einer Zahl von 2—3 Millionen pro Gramm nachweisbar. Dieser Spaltpilz hat sich daher in dem angefeuchteten Futtermittel bei 22° C noch bedeutend vermehrt.

In beiden gärenden Erdnußmehlproben ist eine äußerst rasche Zunahme des Keimgehaltes, aber auch eine rasche Reduktion der Arten eingetreten. Von den 17 vor 48 Stunden vorhandenen Spezies sind bei 37° C nur mehr 5 nachweisbar. Damit darf aber nicht gesagt werden, daß die übrigen Arten im Substrat überhaupt nicht mehr vorhanden seien. In der um das 694 fache vermehrten Zahl vermochten sie ohne bedeutende Vermehrung gar nicht hervorzutreten. Sowohl in Probe I b wie in II a sind die Milchsäurebakterien ausschlaggebend für die Mikroflora. Die Kokken haben eine relativ starke Vermehrung in Probe I b aufzuweisen.

c) Wirkung des frischen Erdnußmehles D auf sterile Milch.

Herstellung der Proben und Gang der Untersuchung in üblicher Weise.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S I	S II	S III
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Std.	3½ Tage	9 Tage
Makroskopisches Aussehen .	feinflockig geronnen, Blähung	grobflockig bis griesig geronnen, Blähung	feinflockig geronnen
Geschmack	schottenartig	unrein säuerlich	stark sauer, bitter
Säuregrad	6,9 n/10 NaOH	12,3 n/10 NaOH	15,3 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S I		S II		S III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	50	6	—	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	8	1	1310	56
Bacterium coli	—	—	—	—	20	1
Bacterium acidi lactici . . .	200	25	200	15	320	14
Bacterium aërogenes	100	13	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	400	50	1100	84	600	26
Gelber Gasbildner	50	6	—	—	50	2
Gelber Säurebildner	—	—	—	—	20	1
Gesamtzahlen .	800	100	1308	100	2320	100

Wie zu erwarten war, sind in der Milch vorwiegend die Milchsäurebakterien zur Entwicklung gelangt, während die anderen Arten mehr oder weniger unterdrückt wurden. Nur Probe S III macht hier eine Ausnahme. — Bei 37° C sind die gasbildenden Milchsäurebakterien stark in den Vordergrund getreten; sie machen 38 Proz. der Bakterienzahl aus. Bemerkenswert ist hier das Auftreten von ganz typischem Bacterium aërogenes. Diese Art scheint stets am besten bei einer Temperatur von 37° C zu gedeihen; bei 22° C und 12° C findet man sie relativ selten, in vorstehender Serie gar nicht. Bei 12° C ist die Bakterienflora am mannigfaltigsten. Hier fand eine recht starke Vermehrung von Bacterium fluorescens statt.

d) Wirkung von gärendem Erdnußmehl D auf sterile Milch.

a) Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl D, das angefeuchtet 1 Tag bei 22° C war. (Vergl. Probe II a p. 146.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S IV a	S IV b	S IV c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17 Std.	2½ Tage	11 Tage
Makroskopisches Aussehen .	gebläht, grobflockig geronnen	gebläht, gallertig-griesig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	schottenartig	rein sauer	säuerlich-bitter
Säuregrad	9,3 n/10 NaOH	14,8 n/10 NaOH	17,4 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S IV a		S IV b		S IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	7	—	—	—
Bacillus subtilis	—	—	2	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	1400	32
Bacterium putidum	—	—	—	—	900	20
Gelber Gasbildner	—	—	20	1	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	100	4	200	9	20	1
Bacterium aërogenes	300	11	30	2	—	—
Bacterium Güntheri	2300	85	2000	88	1400	32
Verflüssigende Kokken . . .	—	—	—	—	300	7
Nicht verflüssigende Diplokokken	—	—	—	—	200	4
Weiße Streptothrichae . . .	5	—	—	—	—	—
Bacillus putrificus coli . . .	—	—	—	—	200	4
Gesamtzahlen .	2705	100	2259	100	4420	100

Die Mikroflora der geimpften 3 Milchproben vorstehender Versuchsserie ist qualitativ ein ziemlich getreues Abbild jener des Impfmaterials. Alle im letzteren vorkommenden Arten, mit einziger Ausnahme des im gärenden Erdnußmehl schon von jeher schwach vertretenen gelben Säurebildners, erschienen bei der einen oder anderen Temperatur in obigen Proben wieder. Es sind sogar 5 neue Spezies hinzugetreten, nämlich ein Gelatine verflüssigender Kokkus, nicht Gelatine verflüssigende Diplokokken, *Bacterium putidum*, eine weiße Streptothrichae und *Bacillus putrificus coli*. Letzterer ist aber bereits in dem frischen Futtermittel in bedeutender Menge nachgewiesen worden.

In bezug auf das Wachstum der einzelnen Bakterienarten bei den 3 gewählten Temperaturen tritt sowohl quantitativ als auch qualitativ ein bedeutender Unterschied zutage. Während bei 37° C und 22° C eine annähernd reine Milchsäuregärung eingetreten ist — bei Probe S IV b machen die Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien 99 Proz., bei S IV a sogar volle 100 Proz. des Keimgehaltes aus — mußte bei 12° C das *Bacterium Güntheri*, wie dies bei den bisherigen Versuchen fast ausnahmslos der Fall war, zugunsten der Fluoreszierenden sehr stark zurücktreten. Außerdem vermochte sich, wohl infolge des in den ersten Tagen nur schwachen Säuregrades der Milch, auch *Bacillus putrificus coli*, ganz bedeutend zu entwickeln.

β) Sterile Milch, geimpft mit Erdnußmehl D, das angefeuchtet 2 Tage bei 37° C war. (Vergl. Probe I b, p. 146.)

Herstellung der Milchproben und Gang der Untersuchung wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S II a	S II b	S II c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Std.	3 ⅓ Tage	3 Wochen
Makroskopisches Aussehen	gallertig geronnen, wenig Gas	feinflockig bis schwach gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	normal	unrein säuerlich	unrein sauer
Säuregrad	13,4 n/10 NaOH	11,7 n/10 NaOH	18,2 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S II a		S II b		S II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium	—	—	4	—	—	—
Bacillus mesentericus	—	—	1	—	—	—
Bacterium Güntheri	450	100	1100	100	3400	100
Verflüssigende Kokken	1	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	451	100	1105	100	3400	100

Auch in dieser Serie kamen in der zu 22° C gestellten Probe in untergeordneter Zahl Sproßpilze vor. — Die Gärung nähert sich hier, wie in keinem anderen Falle vorher, einer reinen Milchsäuregärung. Die wenigen nicht zur Gruppe der Milchsäurebakterien gehörenden Arten treten in Zahl und Bedeutung ganz zurück. Ausnahmsweise sind hier auch alle gasbildenden Arten, selbst in der zu 37° C aufgestellten Probe, ganz zurückgeblieben. Aus der überwiegenden Güntheriflora des Impfmaterials ist eine fast vollständig reine Günther ikultur in der Milch entstanden.

8. Erdnußmehlproben E. u. F.

a) Erdnußmehlprobe E.

Diese Probe wurde direkt von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Am 7. Februar 1910 kam das Material in einer Quantität von ca. ½ kg an. Das makroskopische Aussehen war tadellos; der Geruch stark aromatisch. Die Probe wurde in frischem und angefeuchtetem Zustande nach 12-stündiger Gärung bei 37° C untersucht.

Erdnußmehl E frisch und 12 Std. angefeuchtet bei 37° C (pro g).

Bakterienart	Keimzahl in Erdnußmehl frisch		Keimzahl in Mill. im Erdnußmehl, 12 Std. bei 37° C	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	10 000	4	30	1
Bacillus subtilis	60 000	23	—	—
Bacterium fluorescens	35 000	14	—	—
Bacterium putidum	3 000	1	—	—
Bacterium coli	26 000	10	—	—
Bacterium acidi lactici	24 000	9	500	10
Bacterium Güntheri	—	—	3800	77
Gelber Gasbildner	2 000	1	300	6
Gelber Säurebildner	—	—	100	2
Große Diplokokken in weißen Kolonien	20 000	7	—	—
Kleine „ „ „ „	50 000	19	—	—
Staphylokokken, unbekannt	10 000	4	—	—
Weiße Streptothrichae	20 000	7	—	—
Bacillus putrificus coli	2 000	1	—	—
Kurzstäbchen in gelben, schollenförmigen Kolonien	—	—	210	4
Gesamtzahlen	262 000	100	4940	100

Die Zahlen für das frische Erdnußmehl sind in Einern, diejenigen für das gärende Erdnußmehl in Millionen angegeben. — Die 12 Stunden alte gärende Probe sah makroskopisch noch ziemlich unverändert aus. Doch zeigten sich schon deutliche Spuren der Gasentwicklung.

Wie aus obiger Tabelle hervorgeht, ist die Bakterienflora des frischen Materials eine ziemlich reichhaltige. Von den 12 einzelnen Arten steht der Bacillus subtilis mit 23 Proz. der gesamten Keimzahl an erster Stelle. Verhältnismäßig sehr stark sind in der Probe E auch die Kokken vertreten. Sie erscheinen in verschiedenen Spezies.

Nach 12 Stunden ist bei 37° C in angefeuchtetem Zustande, wie mit einem Schlage, ein ganz anderes Bild der Mikroflora entstanden. Man würde kaum voraussetzen, daß in dieser kurzen Spanne Zeit quantitativ und qualitativ eine so tiefgreifende Veränderung vor sich gehen kann. Von den 12 Arten des frischen Erdnußmehles sind nur noch 3 Arten nachweisbar; 3 neue Spezies sind dazu gekommen: Der gelbe Säurebildner, ferner ein charakteristisches, unbekanntes Kurzstäbchen, das in gelben im Umriß rosettenartigen Schollenkolonien von 1—2½ mm Durchmesser wächst, und endlich ist neu aufgetreten das in gärenden Futtermitteln unserer Versuche nie fehlende Bacterium Güntheri; letzteres ist innerhalb der relativ kurzen Gärdauer auf 77 Proz. der Gesamtflora herangewachsen.

b) Erdnußmehlprobe F.

Die Probe F wurde mit Probe E von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Das Mehl war von normalem, frischem Aussehen. Es wurde doppelt verarbeitet, nämlich frisch und nach einer 12-stündigen, bei 22° C stattgefundenen Gärung. Der Kürze halber sehen wir auch hier von der Angabe der verschiedenen Arten auf den einzelnen Nährböden ab und geben nur die höchste Keimzahl jeder Spezies an, unbekümmert darum, ob sich diese nun auf Gelatineplatten, Agarplatten oder in hoher Schicht vorfinde.

Die frische Probe bezeichnen wir als F; die gärende Probe als F 1. Die Probe F 1 sah nach der 12 Stunden dauernden Gärung noch ganz normal aus. Nur war schwache Gasbildung eingetreten.

Die Zahlenangabe ist bei der Probe F, also dem frischen Material, in absoluten Werten erfolgt; im gärenden Mehle sind die Keimzahlen in Millionen pro Gramm angegeben.

Bakterienflora des frischen und gärenden Materials.

Bakterienart	Probe F		Probe F 1	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	120 000	15	10	1
Bacillus subtilis	330 000	42	—	—
Bacillus megatherium	18 000	2	—	—
Bacterium fluorescens	2 000	—	—	—
Bacterium putidum	1 000	—	—	—
Bacterium coli	30 000	4	40	3
Bacterium acidi lactici	6 000	1	470	35
Bacterium aërogenes	—	—	60	5
Bacterium Güntheri	—	—	530	39
Gelber Gasbildner	5 000	1	200	15
Gelber Säurebildner	7 000	1	—	—
Gelbliche Kokken	11 000	2	—	—
Weiße Kokken	20 000	3	—	—
Rasch bewegliche Sarcina	190 000	24	—	—
Weiße Streptothrichae	30 000	4	—	—
Unbekanntes, sporenbildendes, schlankes Stäbchen	3 000	1	—	—
Bacillus putrificus coli	2 000	—	—	—
Unbekanntes, sporenloses Stäbchen	—	—	30	2
Gesamtzahlen	775 000	100	1340	100

Der Wechsel, den die Bakterienflora innerhalb 12 Stunden erlitten hat, ist ein sehr großer. Von den 15 Arten des frischen Erdnußmehles sind nur noch 4 nachweisbar. Im gärenden Material sind 3 Arten aufgetreten, welche im frischen Mehle nicht nachgewiesen werden konnten, nämlich Bacterium aërogenes, ein unbekanntes, sporenloses Stäbchen, das wir nicht weiter verfolgten, und das Bacterium Güntheri. Auch in Probe F sind die „Heu- und Kartoffelbazillen" sehr reichlich vertreten. Sobald aber durch das Befeuchten eine energische Milchsäuregärung eintritt, gehen diese Sporenbildner größtenteils zugrunde, oder sie werden entwicklungsunfähig. Das vegetative Stadium, in welches diese Pilze durch Befeuchten des Substrates überzugehen gereizt werden, hält der Säurebildung durch das Bacterium Güntheri nur schwer stand; jedenfalls erfolgt keine kräftige Vermehrung.

9. Untersuchung von 5 weiteren Erdnußmehlen.

a) Erdnußmehl G.

Das Material wurde durch gütige Vermittlung von Herrn Dr. H. aus Wettingen (Aargau) beschafft. Dasselbe traf am 4. Februar 1910 mit der Bemerkung ein, es sei wahrscheinlich verfälscht, weil es eine auffallend starke rötlich-bräunliche Färbung zeigte. Doch scheint keine Fälschung vorzuliegen. Die genannte Färbung stammte von der abnormal großen Menge von Samenschalenteilchen. Allerdings ist das Futtermittel wegen dieses starken Gehaltes an Schalenteilchen von geringerer Qualität; im übrigen sah es ziemlich normal aus. Die Probe G wurde, wie die beiden vorhergehenden, in frischem Zustande und nach kurzer Gärdauer (9 Stunden angefeuchtet bei 37° C) untersucht. Die Zahlen für das frische Material sind in absoluten Werten (Einern), die Zahlen für das gärende Material aber in Millionen angegeben.

Erdnußmehl G frisch und angefeuchtet 9 Stunden bei 37° C (Zahlen pro g).

Bakterienart	Probe G frisch		Probe G 9 Std. bei 37° C	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	40 000	4	—	—
Bacillus subtilis	500 000	47	2	—
Bacillus megatherium	20 000	2	—	—
Bacterium fluorescens	30 000	3	—	—
Bacterium coli	50 000	5	—	—
Bacterium acidi lactici	90 000	9	330	52
Bacterium aërogenes	—	—	60	9
Bacterium Güntheri	20 000	2	20	3
Gelber Gasbildner	—	—	20	3
Weiße Streptothrix	110 000	10	—	—
Gelblicher Actinomycet	10 000	1	—	—
Sproßpilz	40 000	4	—	—
Kokken in rötlichen Kolonien	20 000	2	—	—
Kokken in weißen Kolonien	80 000	8	—	—
Bacillus putrificus coli	30 000	3	—	—
Unbekanntes Stäbchen in gelben, schollenförmigen Kolonien	—	—	210	33
Gesamtzahlen	1 040 000	100	642	100

Bemerkenswert ist bei dieser Probe vorerst die große Zahl der Keime. Bis dahin wurde die Zahl von 1 Million Bakterien pro Gramm noch von keiner Erdnußmehlprobe erreicht. Es mag dies wohl darauf hindeuten, daß die Hauptmenge der Spaltpilze an den Fragmenten von Frucht- und Samenschalen haften. Wie schon erwähnt, enthielt Probe G von den letzteren abnormal große Mengen. — Im allgemeinen wiederholt sich in bezug auf die Veränderung der Mikroflora auch in vortsehendem Versuche die gleiche Erscheinung, wie bei den Proben E und F. Im Verlaufe einer kurzen Zeit ist eine rasche und gründliche Veränderung der Bakterienflora eingetreten. Von den 13 Arten des frischen Erdnußmehles sind nach 9 Stunden nur mehr 3 in einer für den Nachweis genügenden Zahl vorhanden. Bei der gewählten Temperatur von 37° C sind speziell die Gasbildner auf Kosten des Bacillus subtilis zu starker Entwicklung gelangt. Die letztgenannte Art ist der Hauptvertreter in der Mikroflora des frischen Materials. Sie erreicht mit dem verwandten Bacillus mesentericus 51 Proz. des gesamten Keimgehaltes, während die quantitativ nächstfolgende Art, die weiße Streptothrix, nur mit 10 Proz. beteiligt ist. — Das Bact. Güntheri ist zwar im frischen Erdnußmehl anwesend, jedoch erlangt es in der gärenden Probe nach 9 Stunden vorerst nur noch eine recht untergeordnete Bedeutung. Als Hauptvertreter behaupten zunächst die gasbildenden Milchsäurebakterien und das schon in Probe F 1 isolierte sporenlose Kurzstäbchen in derben, kompakten, schollenförmigen Kolonien den ersten Rang. Bacillus mesentericus und B. subtilis sind in der um rund das 617-fache gestiegenen Keimzahl nur noch knapp nachweisbar. Diese beiden Arten haben sich daher im ersten Stadium der Gärung nur relativ bescheiden vermehrt.

b) Erdnußmehlproben H u. J.

Die Probe H stammt von der agrikulturchemischen Untersuchungsstation in Zürich. Sie wurde am 26. November 1909 zum Zwecke der chemischen Untersuchung an die Station eingesandt und von hier am 29. November 1909 zur Vornahme der bakteriologischen Analyse abgeholt. Aussehen der Probe normal, Geruch typisch nach Erdnuß.

Das Erdnußmehl J erhielten wir aus der Futtermittelhandlung J. B. in Zürich. Aussehen der Probe sehr gut; typischer aromatischer Erdnußmehlgeruch. — Von den beiden Proben H und J wurden am 29. November Kulturen in üblicher Weise angelegt.

Untersuchungsergebnisse (Zahlen pro g).

Bakterienart	Erdnußmehlprobe H		Erdnußmehlprobe J	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	10 000	1
Bacillus subtilis	—	—	60 000	8
Bacillus megatherium	—	—	10 000	1
Bacterium fluorescens	10 000	1	—	—
Bacterium acidi lactici	140 000	15	220 000	29
Bacterium Güntheri	500 000	53	300 000	40
Gelber Säurebildner	20 000	2	50 000	7
Verflüssigende Kokken	130 000	14	—	—
Nicht verflüssigende Kokken	—	—	30 000	4
Weiße Streptothrichae	30 000	3	—	—
Langstäbchen, schlank, sporenlos	100 000	10	—	—
Kurzstäbchen, unbeweglich, rötliche Kolon.	20 000	2	—	—
Gelber Gasbildner	—	—	70 000	10
Gesamtzahlen	950 000	100	750 000	100

Die Mikroflora der Probe H zeigt eine ganz bedeutende Abweichung von jener der bisher untersuchten Erdnußmehle. Während fast ausnahmslos alle Proben einen namhaften Gehalt von Bacillus mesentericus und Bacillus subtilis aufwiesen, konnte hier diese Bakteriengruppe nicht nachgewiesen werden. Dagegen tritt das Bacterium Güntheri ausnahmsweise stark in den Vordergrund, was zu der Vermutung führt, daß, trotzdem der Gesamtkeimgehalt des Untersuchungsmaterials nicht gerade sehr hoch ist, das Mehl schon früher einmal in feuchtem Zustande eine mehr oder weniger intensive Gärung durchgemacht hat, die ja in der Regel auf eine ziemlich einseitige Milchsäuregärung hinausläuft, und aus dem Umstande, daß die Gruppe der Heu- und Kartoffelbazillen im allgemeinen säurefliehend

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ist, läßt sich das Fehlen derselben in der Probe H vielleicht, zum Teil wenigstens, erklären.

Das Erdnußmehl J nimmt gleichsam eine Mittelstellung ein zwischen der Probe H und der Mehrzahl der übrigen bisher untersuchten Proben. Die Subtilis-mesentericus-Gruppe ist ziemlich zurücktretend und das Bacterium Güntheri steht an erster Stelle. Auch die Gasbildner nehmen einen großen Prozentsatz der Bakterienflora ein. Im übrigen muß das Erdnußmehl J als eine der artenärmsten von den zur Untersuchung gelangten Erdnußmehlproben bezeichnet werden.

c) Erdnußmehlproben K u. L.

Das Erdnußmehl K wurde am 30. November 1909 durch gütige Vermittelung von Herrn Tierzuchtinspektor A. Th. aus Inwil (Luzern) zugesandt. Aussehen ziemlich normal, Farbe etwas dunkel. — Die Probe L traf am 1. Dezember 1909 durch gefl. Vermittelung von Herrn Dr. H. aus W. hier ein. Aussehen der Probe normal. Verarbeitung beider Proben wie üblich.

Bakteriengehalt der Erdnußmehlproben K und L (Zahlen pro g).

Bakterienart	Probe K		Probe L	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	20 000	1	30 000	2
Bacillus subtilis	—	—	40 000	3
Bacillus megatherium	20 000	1	30 000	2
Bacterium fluorescens	—	—	80 000	6
Bacterium coli	10 000	1	—	—
Bacterium acidi lactici	60 000	3	80 000	6
Gelber Gasbildner	50 000	2	100 000	7
Gelber Säurebildner	1 320 000	64	60 000	5
Bacterium punctatum	—	—	30 000	2
Streptothrix chromogena	20 000	1	30 000	2
Gelbe, nicht verflüssigende Kokken	400 000	19	20 000	1
Gelbe, verflüssigende Kokken	—	—	20 000	1
Verflüssigende Kokken, weiße Kolonien	—	—	30 000	2
Nicht verflüssigende Kokken, weiße Kolonien	+	—	—	—
Unbekannte Stäbchen verschiedener Art (5 Typen)	—	—	820 000	61
Streptothrix, weiße Kolonien	160 000	8	—	—
Gesamtzahlen	2 060 000	100	1 370 000	100

Der Bakteriengehalt der Probe K muß als ein abnormal hoher bezeichnet werden. Das entscheidende Übergewicht kommt hier einem nicht sporenbildenden Kurzstäbchen, dem gelben Säurebildner, zu. In sehr bedeutender Menge treten auch die Kokken auf.

Auch der Keimgehalt von Erdnußmehl L steht bedeutend über Mittel. Eine ganze Reihe nicht bekannter Arten nehmen zusammen 60 Proz. der gesamten Mikroflora ein. Dies ist die bis dahin höchste der gefundenen Zahlen von unbekannten Spezies. Außer diesem großen Prozentsatz von unbekannten Arten kommen mehrere, ziemlich regelmäßig nachgewiesene Bakterienarten vor, vor allem peptonisierende Arten. Die Kokken spielen hier eine nur untergeordnete Rolle.

Erdnußkuchen.

Es wurden im ganzen 7 Proben von Erdnußkuchen verschiedenster Herkunft untersucht. 2 derselben wurden in frischem Zustande und in verschiedenen Gästadien, die anderen 5 nur in frischem Zustande auf den Bakteriengehalt geprüft. Die Untersuchung gestaltete sich wie folgt: Das betreffende Stück Kuchen wurde vorerst mit sterilisiertem Messer ringsum von der oberflächlichen Schichte befreit. Dann wurde von der frischen Schnittfläche die nötige Menge Untersuchungsmaterial in kleinen Brocken in eine sterilisierte Glasdose abgeschrotet. Hernach wurden 2 g der so erhaltenen Masse abgewogen und in einem Tigel mit der 10-fachen Menge sterilen Wassers zu einem feinen Brei zerrieben. Nachher wurden auf bekannte Weise die notwendigen Verdünnungen hergestellt und von den Aufschwemmungen Kulturen angelegt.

10. Erdnußkuchen M.

a) Frisches Material.

Diese Probe wurde von Herrn Landwirtschaftslehrer J. A., Plantahof, Graubünden, in freundlicher Weise besorgt. Das Untersuchungsmaterial langte am 5. Februar 1910 ein und wurde am 19. Februar in oben angegebener Weise verarbeitet. Das makroskopische Aussehen des Materials war gut, der Kuchen zeigte relativ viel rötliche Punkte, von Samenschalenteilchen herrührend; Konsistenz desselben mittelhart.

Die Erdnußkuchenprobe wurde vorerst in frischem Zustande, dann aber auch in verschiedenen Gärstadien, nämlich angefeuchtet nach 9 Stunden, 24 Stunden und 4 Tagen, bei einer Aufbewahrungstemperatur von 22° C untersucht.

Untersuchungsergebnis der Erdnußkuchenprobe M frisch
(Zahlen pro g).

Bakterienart	Erdnußkuchen M	
	absolut	%
Bacillus mesentericus	300 000	9
Bacillus subtilis	200 000	6
Bacterium fluorescens	3 000	—
Bacterium putidum	40 000	1
Bacterium acidi lactici	700 000	21
Bacterium aërogenes	300 000	9
Gelber Gasbildner	900 000	27
Gelber Säurebildner	200 000	6
Streptococcus, gelb, verflüssigend	200 000	6
Weiße Streptothrix	200 000	6
Sproßpilz	300 000	9
Gesamtzahl	3 343 000	100

Es ließen sich pro Gramm trockenen Kuchens 3 343 000 Keime nachweisen, eine Zahl, die man in Anbetracht, daß der Kuchen total ausgetrocknet und ziemlich hart war, gar nicht erwartet hätte. Alle Arten konnten bestimmt werden. Der Hauptanteil kommt den Gasbildnern zu. Bacillus mesentericus und Bacillus subtilis sind in ansehnlicher Zahl vertreten. Ein nicht weiter verfolgter Sproßpilz kam in einer Menge von 9 Proz. auf den Gelatineplatten vor; in der hohen Schicht fanden sich keine neuen Arten. Anaërobe fehlten gänzlich.

b) Gärendes Material.

Von der mit sterilem Messer abgeschroteten Masse wurden 3 Proben zu je 40 g in einem sterilen Becherglas abgewogen. Jeder Probe wurden 40 ccm steriles Wasser beigegeben und dann fand eine tüchtige Durchmischung der Masse statt. Die so hergestellten Proben kamen zu 22° C und es wurde nach 9 Stunden, 24 Stunden und 4 Tagen je eine dieser gärenden Proben untersucht.

Benennung M 1 = Gärendes Material 9 Std. bei 22° C
M 2 = „ „ 24 „ „ 22° C
M 3 = „ „ 4 Tage „ 22° C

Nach 9 Stunden war die gärende Probe M 1 makroskopisch noch ziemlich unverändert. Nach 24 Stunden war bei M 2 eine deutliche Blähung bemerkbar, der Geruch der Probe war schwach säuerlich. Bei der 4 Tage alten Gärprobe endlich war die Oberfläche, wie früher bei den gärenden Erdnußmehlproben, schwach rötlich-violett verfärbt. Der Geruch war, besonders beim Umrühren der Masse, ausgesprochen säuerlich.

Mikroskopischer Befund.
(Zahlen in Millionen pro Gramm lufttrockenen Kuchens berechnet.)

Bakterienart	Probe M 1		Probe M 2		Probe M 3	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	2	3	12	—	—	—
Bacterium coli	0,6	—	80	2	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	23	28	640	17	100	1
Bacterium aërogenes	5	6	70	2	—	—
Gelber Gasbildner	8	10	34	1	—	—
Gelber Säurebildner	0,3	—	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	43	53	2930	78	7300	99
Gesamtzahlen	81,9	100	3766	100	7400	100

In der kurzen Frist von 9 Stunden hat sich die Bakterienflora bei Probe M 1 stark verändert. Vollständig zurückgetreten sind die Fluoreszenten, der gelbe verflüssigende Streptokokkus, die Streptothrichae und der Sproßpilz. Auch Bacillus subtilis ist nur ganz spärlich anwesend. In raschem Tempo hat sich dagegen das Bacterium Güntheri vermehrt; aber auch die gasbildenden Milchsäurebakterien haben sich rasch entwickelt. Der Gesamtkeimgehalt des Futtermittels ist innerhalb 9 Stunden um rund das 24-fache gestiegen. Die dem frischen Material und der Probe M 1 gemeinsamen Arten aber haben sich im Durchschnitt um das 21-fache vermehrt.

Nach 24-stündiger Gärung hat sich die Mikroflora im Sinne einer überhand nehmenden Milchsäuregärung weiter entwickelt. Der gelbe Gasbildner ist relativ von 10 auf 1 Proz. zurückgegangen. Im Gegensatz dazu sind die Erreger der Milchsäuregärung von 87 auf 99 Proz. gestiegen. Vor allem hat das Bacterium Güntheri eine sehr rasche Zunahme erfahren. Bemerkenswert ist auch, daß diese Art auf den Plattenkulturen zum größten Teil in ganz kleinen, makroskopisch mit Mühe noch wahrnehmbaren Kolonien gewachsen war und daß etwa ¾ aller Individuen ganz typische Kurzstäbchen von 1—1½ μ × ¾ μ aufwiesen, die bei Weiterzüchtung in steriler Milch wieder zum Teil in deutliche Kettenformen übergingen, eine Erscheinung, die von L. Müller[1]) eingehend studiert wurde.

In der Probe M 3 ist eine fast ausschließlich reine Milchsäuregärung eingetreten. In ganz untergeordneter Zahl konnte noch Bacillus mesentericus (0,4 Mill.) und der gelbe Gasbildner (0,5 Mill.), welche in der Übersicht nicht angeführt wurden, nachgewiesen werden. Auch hier sind fast alle Kolonien von Bacterium Güntheri beinahe mikroskopisch klein und dieser Spaltpilz ist teils in ganz typischen Zweierformen, teils in deutlichen Kurzstäbchen, die kaum zugespitzt erscheinen, vorhanden.

Der Versuch mit Erdnußkuchen M beweist uns aufs neue mit aller Deutlichkeit, daß die Gärung in befeuchteten Kraftfuttermitteln von einem ursprünglich gemischten Gärungsvorgang nach und nach in eine ganz ausgesprochene Milchsäuregärung übergeht.

11. Erdnußkuchen N.

a) Probe frisch.

Diese Probe wurde direkt von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Eingang der Sendung am 20. Februar 1910; makroskopisches Aussehen tadellos, Kuchen relativ weich, frisch, aromatisch. Auch diese Probe wurde frisch und in gärendem Zustande analysiert und zwar nach einer Gärdauer von 12 und 48 Stunden bei 37° C. Herstellung und Untersuchung der Proben wie bei Erdnußkuchen M.

Bakterienflora des frischen Erdnußkuchens N pro g.

	Zahl absolut		%
Bacillus mesentericus	300 000	=	30
Bacillus subtilis	100 000	=	10
Bacterium fluorescens	3 000	=	—
Bacterium putidum	4 000	=	—
Bacterium acidi lactici	50 000	=	5
Bacterium aërogenes	10 000	=	1
Gelber Gasbildner	400 000	=	40
Gelber Säurebildner	80 000	=	8
Verflüssigende Kokken	10 000	=	1
Unbekanntes Kurzstäbchen in gelben Kolonien (Schollenkolonien)	40 000	=	4
Streptothrichae weiß	2 000	=	—
Bacillus putrificus coli	8 000	=	1
Gesamtzahl	1 007 000	=	100

In bezug auf die qualitative Zusammensetzung besteht zwischen vorstehender Probe und der Probe M eine gewisse Übereinstimmung. Beiderorts ist die Mesentericus-subtilis-Gruppe stark vertreten und der maximale Prozentsatz fällt dem gelben Gasbildner zu. Statt des Sproßpilzes tritt jedoch in dieser Probe der Bacillus putrificus coli in untergeordneter Menge auf.

b) Erdnußkuchen N in gärendem Zustande.

Am 13. Februar 1910 wurden zwei Proben vom Erdnußkuchen N angefeuchtet und 12 bzw. 48 Stunden bei 37° C in Gärung belassen. Benennung der Proben N 1 bzw. N 2. Probe N 1 zeigte nach 12 Stunden eine nur schwache makroskopische Veränderung, indem eine leichte gelbliche Verfärbung und ein kaum merklich säuerlicher Geruch wahrzunehmen war.

---

[1]) Müller, Leo, Vergleichende Versuche über Milchsäurebakterien usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 17. p. 468 ff.)

Die während 48 Stunden in Gärung belassene Probe N 2 wies eine etwas deutlichere gelbliche Verfärbung auf. Oberflächlich wucherte eine fadenziehende Masse des Bacillus mesentericus. Das Untersuchungsmaterial war beim Umrühren vorerst trockenbreiig, nahm aber bei weiterer Durchmischung bald eine teigartige, zähe Konsistenz an. Das makroskopische Aussehen sprach deutlich dafür, daß in der ersten Zeit der Gärung eine bedeutende Blähung stattgefunden hatte. Der Geruch der Probe war säuerlich, schwach nach Ammoniak.

Untersuchungsergebnisse
(Zahlen in Millionen pro g lufttrockenen Erdnußkuchens berechnet).

Bakterienart	Probe N 1		Probe N 2	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	4	—
Bacterium acidi lactici	500	19	310	13
Bacterium aërogenes	1160	43	120	5
Bacterium Güntheri	914	34	1900	78
Gelber Gasbildner	100	4	100	4
Gelber Säurebildner	—	—	10	—
Unbekanntes Kurzstäbchen in gelben Kolonien	10	—	—	—
Gesamtzahlen	2684	100	2444	100

In Probe N 1 kamen außer den fünf angeführten Arten noch Bacillus mesentericus und B. subtilis in geringer Zahl vor. Die Zunahme der Keimzahl innerhalb 12 Stunden beträgt hier das 2675-fache. — Im 48 Stunden alten Material macht sich schon ein Rückgang der Bakterienzahl geltend, indem die Gesamtzahl der lebensfähigen Organismen hier nur mehr das 2427-fache jener des frischen Erdnußkuchens erreichte. Immerhin aber ist auch diese Zahl noch eine ganz bedeutende.

In bezug auf die qualitative Veränderung der Bakterienflora werden die früher gemachten Erfahrungen auch in vorstehendem Versuche bestätigt. Sowohl bei 22° als auch bei 37° C strebt die sehr kompliziert zusammengesetzte ursprüngliche Flora nach kurzer Zeit mehr und mehr einer überwiegenden Milchsäureproduzentenflora zu. Der Einfluß der Gärtemperatur kommt namentlich im ersten Stadium der Gärung, in einer reichlichen Entwicklung der Gasbildner deutlich zum Ausdruck.

12. Erdnußkuchen O und P.

Die Probe O wurde von der Futtermittelhandlung B. in Bern durch gefällige Vermittlung von Herrn Dr. J. K. am 1. Dezember 1909 zugesandt. Das makroskopische Aussehen war normal, der Kuchen jedoch von sehr harter Beschaffenheit. Verarbeitung am 21. Februar 1910 auf übliche Weise. — Die Kuchenprobe P wurde am 21. November 1909 von der agrikulturchemischen Station in Zürich abgeholt. Beschaffenheit wie Probe O, jedoch schwach ranziger Geruch. Verarbeitung am 21. Februar 1910 wie üblich.

Mikroskopischer Befund siehe auf folgender Seite.

Die Probe O weist einen auffallend geringen Keimgehalt auf. Von den sieben untersuchten Proben von Erdnußkuchen ist sie die weitaus keimärmste; der durchschnittliche Bakteriengehalt der untersuchten Erdnußkuchen ist mehr als das Vierfache desjenigen von Probe O. Ohne Zweifel haben in dem äußerst stark eingetrockneten Futtermittel eine große Zahl von Keimen ihre Entwicklungsfähigkeit eingebüßt.

Mikroskopischer Befund (Zahlen pro g).

Bakterienart	Probe O		Probe P	
	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	150 000	36	400 000	42
Bacillus subtilis	50 000	12	200 000	21
Bacillus megatherium	10 000	2	10 000	1
Bacterium fluorescens	20 000	5	3 000	—
Bacterium coli	—	—	6 000	1
Bacterium acidi lactici	100 000	24	100 000	11
Bacterium aërogenes	—	—	10 000	1
Gelber Gasbildner	10 000	2	10 000	1
Diplococcus in weißen Kolonien	40 000	10	100 000	11
Staphylococcus, verflüssigend	—	—	40 000	4
Unbekanntes, sporenloses Stäbchen, gelbl. Kol.	—	—	60 000	6
Sarcina mobilis	20 000	5	—	—
Sproßpilz	10 000	2	—	—
Torula-Spezies	10 000	2	—	—
Bacillus putrificus coli	800	—	8 000	1
Gesamtzahlen	420 800	100	947 000	100

Auch die Gesamtbakterienzahl von Probe P steht noch weit unter Mittel, trotzdem hier pro Gramm 947 000 Pilzkeime gezählt wurden.

Bemerkenswert ist auch der Artenreichtum der beiden Proben; in Erdnußkuchen O konnten 11, in Kuchen P 12 verschiedene Spezies nachgewiesen werden. Die weitaus größte Bedeutung kommt beiderorts der Mesentericus-subtilis-Gruppe zu.

13. Erdnußkuchen Q, R und S.

Erdnußkuchen Q wurde von Muri (Aargau) durch Herrn J. J. am 21. Januar 1910 eingesandt. Das makroskopische Aussehen war normal; der Kuchen war relativ weich und krümelig, aber stark von Fasern aus den Preßtüchern durchsetzt. Verarbeitung am 29. Februar 1910.

Probe R stammt vom Warenlager einer zentralschweizerischen landwirtschaftlichen Genossenschaft in S. Vermittlung durch Herrn J. St.; Eingang der Probe am 29. Januar 1910; Verarbeitung am 27. Februar 1910.

Die Erdnußkuchenprobe S endlich ging am 7. Februar direkt von einer deutschen Großfirma aus M. ein. Makroskopisches Aussehen der Probe tadellos; der Kuchen war ganz frisch, hellgrau, krümelig weich und aromatisch riechend. — Verarbeitung am 27. Februar 1910.

Das Untersuchungsresultat findet sich auf der folgenden Seite.

Die beiden Proben Q und R sind außerordentlich keimreich. Dieselben weisen einen Bakteriengehalt von über 3 Millionen pro Gramm auf; eine Zahl, die selbst bei keiner einzigen Erdnußmehlprobe auch nur annähernd erreicht wurde. Die Probe S dagegen steht in ihrem Keimgehalt bedeutend unter den Mittelwerten.

Ebenso überraschend wie die quantitativen Ergebnisse sind die qualitativen. Kuchenprobe S enthielt 13, Probe Q barg 14 und R sogar 17 verschiedene Bakterienarten. Diese sehr mannigfaltige Zusammensetzung der Bakterienflora spricht sehr dafür, daß die Proben, trotz des abnormal hohen Keimgehaltes, dennoch keinen eigentlichen Gärungsprozeß in angefeuchtetem Zustande durchgemacht haben; denn in diesem Falle würde sich nach unseren Erfahrungen die Artenzahl sofort sehr stark reduzieren.

Mikroskopischer Befund (Zahlen pro g).

Bakterienart	Probe Q		Probe R		Probe S	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	300 000	9	500 000	16	200 000	24
Bacillus subtilis	240 000	7	200 000	6	100 000	12
Bacillus megatherium	—	—	1 000	—	—	—
Bacillus tumescens	—	—	300 000	10	—	—
Bacterium fluorescens	50 000	2	10 000	—	4 000	1
Bacterium putidum	120 000	4	—	—	—	—
Bacterium coli	30 000	1	6 000	—	70 000	9
Bacterium acidi lactici	180 000	6	400 000	13	100 000	12
Bacterium aërogenes	10 000	—	700 000	22	100 000	12
Bacterium Güntheri	—	—	30 000	1	10 000	1
Gelber Gasbildner	1 200 000	37	300 000	10	200 000	24
Gelber Säurebildner	500 000	15	100 000	3	10 000	1
Kurzstäbchen in gelben Kol.	360 000	11	200 000	6	30 000	4
Kurzstäbchen in rötl. Kol.	30 000	1	60 000	2	2 000	—
Diplococcus in weißen Kol.	100 000	3	100 000	3	—	—
Sarcina mobilis	—	—	—	—	1 000	—
Sproßpilz	100 000	3	80 000	2	—	—
Torula-Spezies	—	—	1 000	—	—	—
Weiße Streptothrix	20 000	1	200 000	6	—	—
Bacillus putrificus coli	—	—	—	—	600	—
Gesamtzahlen	3 240 000	100	3 188 000	100	827 600	100

14. Die in Erdnußmehl und Erdnußkuchen am häufigsten angetroffenen Bakterienarten.

Art der Probe	Gesamtkeimzahl pro g	Prozentuelle Vertretung einzelner Arten									
		B. mesentericus u. subtilis	Fluoreszierende	Coli-aërogenes-Gruppe	Gelb. Gas- u. gelber Säurebildn.	Verschiedene Kokken	Sproßpilze	Streptothrichaeen	B. putrificus	Rest	Summe
I. Erdnußmehle											
Probe A	592 000	27	4	9	5	10	3	4	+	38	100
„ B	585 000	13	3	6	69	2	—	2	—	5	100
„ C	302 000	12	1	13	1	10	—	49	2	12	100
„ D	621 000	22	8	7	8	8	+[1]	+	33	14	100
„ E	262 000	27	15	19	1	30	—	7	1	—	100
„ F	775 000	57	+[1]	5	2	5	—	4	+	27[2]	100
„ G	1 040 000	51	3	14	—	10	4	10	3	5	100
„ H	950 000	+	1	15	2	14	—	3	—	65[3]	100
„ J	750 000	9	—	29	17	4	—	—	—	41[4]	100
„ K	2 060 000	1	—	4	66	19	—	9	—	1	100
„ L	1 370 000	5	6	6	12	4	—	2	—	65[5]	100
II. Erdnußkuchen											
Probe M	3 343 000	15	1	30	33	6	9	6	—	—	100
„ N	1 007 000	40	+	6	48	1	—	+	1	4	100

---

[1] + bedeutet: Nur in kleiner Menge, unter ½ % vorhanden. [2] Davon 24 % bewegliche Sarcina. [3] Davon 53 % Bacterium Güntheri. [4] Davon 40 % Bacterium Güntheri. [5] Meistens unbekannte Stäbchen.

Fortsetzung.

Art der Probe	Gesamtkeimzahl pro g	Prozentuelle Vertretung einzelner Arten									
		B. mesentericus u. subtilis	Fluoreszierende	Coli-aërogenes-Gruppe	Gelb. Gas- u. gelber Säurebildn.	Verschiedene Kokken	Sproßpilze	Streptothrichaeen	B. putrificus	Rest	Summe
Probe O	420 800	48	5	24	2	10	2	—	+	9	100
„ P	947 000	63	+[1]	13	1	15	—	—	1	7	100
„ Q	3 240 000	16	6	7	52	3	3	1	—	12	100
„ R	3 188 000	22	+	35	13	3	2	6	—	19	100
„ S	827 600	36	1	33	25	—	—	—	+	5	100
III. Durchschnittszahlen											
Durchschnitt aller Mehle	846 091	20,4	3,7	11,6	16,6	10,6	0,6	8,2	3,5	24,8	100
Durchschnitt aller Kuchen	1 853 343	34,3	1,9	21,1	24,9	5,4	2,3	1,8	0,3	8,0	100
Gesamtdurchschnitt	1 237 800	25,7	3,0	15,4	19,8	8,6	1,3	5,7	2,2	18,3	100

15. Zusammenfassung der wichtigsten Resultate aus der Erdnußuntersuchung.

I. Frische Erdnuß-Futtermittel.

1. Keimgehalt: Die Zahl der Spaltpilze, welche mittels der am besten geeigneten Nährböden aus frischen, normal aussehenden Erdnußkuchen und -mehlen isoliert werden können, ist eine sehr große. Sie beträgt im Durchschnitt der 18 von uns untersuchten Proben 1 237 800 pro Gramm trockenes Material; im Minimum 262 000, im Maximum 3 343 000.

Der Keimgehalt der Erdnußkuchen ist, in Übereinstimmung mit den Befunden von Burri[2]) und im Gegensatz zu der noch weit verbreiteten Anschauung keineswegs geringer, als jener der Erdnußmehle. Im Gegenteil, die durchschnittliche Keimzahl der sieben untersuchten Erdnußkuchen beträgt, wie aus obiger Zusammenstellung hervorgeht, 1 853 343 entwicklungsfähige Spaltpilze pro Gramm. Für die 11 von uns untersuchten Mehle jedoch ist die bezügliche Zahl nur 846 091. Die Erdnußkuchen sind demnach im Durchschnitt um ca. 119 Proz. keimreicher als die Mehle. Damit stellen sich die Ergebnisse unserer Untersuchungen in direkten Gegensatz zu den Befunden von O. Emmerling (47), der die Erdnußmehle im allgemeinen als pilzreicher bezeichnet als die Kuchen.

Der absolute Bakteriengehalt eines Erdnußfuttermittels ist kein verläßlicher Gradmesser für die Unverdorbenheit und Frische dieses Futtermittels.

2. Arten: Die qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora sowohl in Erdnußmehl als in Erdnußkuchen ist eine ziemlich komplizierte. Von den insgesamt von uns nachgewiesenen 44 Arten entfallen im Mittel auf eine Probe 13 verschiedene Bakterienspezies. Durchschnittlich sind die frischen Erdnußmehle etwas artenreicher als die Erdnußkuchen.

Am weitaus häufigsten kommen, sowohl in Erdnußmehlen als auch in Erdnußkuchen, die Vertreter aus der Gruppe der sogenannten Heu- und

---

[1]) + bedeutet: Nur in kleiner Menge, unter ½ % vorhanden.

[2]) Manuskript der Vorlesung: Bakteriologie für Landwirte 1906.

Kartoffelbazillen, nämlich Bacillus mesentericus vulgatus Flügge und B. subtilis F. Cohn, vor. Im Mittel aller Proben nehmen diese beiden niemals fehlenden Arten nicht weniger als 25,7 Proz. des gesamten Keimgehaltes ein. Auffallend ist dabei, daß die Erdnußkuchen im Durchschnitt bedeutend reicher an diesen Sporenbildnern sind als die Erdnußmehle; denn in den ersteren waren sie mit 34,3 Proz., in den letzteren aber mit 20,4 Proz. im Mittel aller Proben nachweisbar. Diese Tatsache mag wohl, zum Teil wenigstens, dem Umstand zuzuschreiben sein, daß die Kuchen im allgemeinen bedeutend stärker ausgetrocknet sind als die Mehle, weshalb die weniger resistenten Nichtsporenbildner zum Teil nach und nach ihre Vermehrungsfähigkeit einbüßen werden, wodurch dann ein prozentisches Übergewicht der Sporenbildner bedingt werden kann.

Das Bacterium herbicola aureum Burri et Düggeli, das ein sehr regelmäßiger Bewohner der Kleie ist, kommt in den Erdnußfuttermitteln nur ganz ausnahmsweise vor. An dessen Stelle treten sehr häufig Arten aus der Gruppe der gasbildenden Milchsäurebakterien, die wir kurz Coli-aërogenes-Gruppe nennen wollen. Neben diesen Gasbildnern ließen sich in beinahe allen Proben die beiden von Holliger[1]) beschriebenen, dem Bacterium coli nahestehenden, in gelblichen Kolonien wachsenden Kurzstäbchen, der gelbe Gasbildner Holliger und der gelbe Säurebildner Levy, welche vom genannten Autor so bezeichnet wurden, nachweisen. — Auch die Fluoreszenten sind in Erdnußkuchen und -mehlen fast immer, wenn gewöhnlich auch in nur bescheidener Zahl, anwesend.

Eine besonders im Erdnußmehl recht häufig und oft in großer Zahl auftretende Pilzart scheint Streptothrix alba zu sein, die von Lehmann und Neumann in der neuesten Auflage ihres Werkes (101) als Actinomyces chromogenes Gasperini β alba L. et N. bezeichnet wird. — Auch die Kokken gehören zu der charakteristischen Flora der frischen Erdnußfuttermittel. Nur in einer einzigen Probe konnten wir diese meist sehr indifferenten Organismen nicht nachweisen. Im großen Durchschnitt erwiesen sich die Erdnußmehlproben bedeutend kokkenreicher als die Kuchen (10,6 : 5,4 Proz.).

Was nun schließlich das Vorkommen von Bacillus putrificus coli Bienstock anbetrifft, so ist hervorzuheben, daß dieser Pilz in Erdnußmehlen verhältnismäßig häufiger getroffen wurde, und, was wichtiger ist, in viel größerer Quantität vorkommt, als in den Kuchen. Das Verhältnis ist 3,5 : 0,3 oder ca. 12 : 1.

II. Gärendes Material.

1. Keimgehalt: In bezug auf den Keimgehalt bei angefeuchteten Erdnußkuchen und -mehlen ist das Untersuchungsergebnis ein ganz analoges wie bei den bezüglichen Kleieproben. Diese Ergebnisse sind, kurz zusammengefaßt, folgende: Bei 37° C rasch ansteigende, intensive Bakterienvermehrung, aber auch relativ frühzeitiger Rückgang des quantitativen Keimgehaltes. Bei 22° C bedeutend langsamere Vermehrung, Erreichung viel höherer Maximalzahlen und Rückgang derselben in mäßigerem Tempo.

2. Arten: In gärenden Erdnußfuttermitteln überwiegt in den ersten 6 bis 8 Stunden des Gärungsprozesses noch die ursprünglich vorhandene „Stammflora“ des frischen Materials. Diese vermehrt sich aber teilweise nur

---

[1]) Holliger, W., Bakt. Untersuchungen über Mehlteiggärung. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. p. 305.)

sehr langsam. Nach und nach gewinnen regelmäßig die Milchsäurebakterien das entscheidende Übergewicht. Von dieser Gruppe vermehren sich im ersten Stadium der Gärung die Gasbildner gegenüber den Nichtgasbildnern, namentlich bei 37° C, sehr stark. Nach Verlauf von 24 Stunden aber hat in allen Fällen das Bacterium Güntheri L. et N. die Oberhand.

Der metabiotische Charakter des Gärungsprozesses, auf welchen schon bei der Kleiegärung hingewiesen wurde, hat sich auch hier bestätigt.

III. Einwirkung des frischen und des gärenden Materials auf Milch.

Die auf p. 117—120, sowie auf p. 136—138 festgestellten Untersuchungsresultate aus den beiden Hauptproben A und B, konnten durch die Ergebnisse der Versuche mit vorstehenden Proben C bis S ergänzt und in allen wesentlichen Punkten bestätigt werden.

III. Sesam.

1. Vorbemerkungen.

Die Rückstände bei der Sesamölfabrikation sind, wie jene der Erdnußölbereitung, ein sehr viel verwendetes und besonders wegen des hohen Eiweißgehaltes sehr geschätztes Futtermittel für landwirtschaftliche Nutztiere. Der Sesam stammt aus den tropischen und subtropischen Gegenden, besonders aus Ost- und Südasien, wo er als weit verbreitete Pflanze vielfach das Getreide an Bedeutung übertrifft. Ferner wird an der ganzen Küste von Afrika, mit Ausnahme des südlichen Gebietes, und endlich auch im mittleren Amerika viel Sesam angebaut.

Da die Sesamrückstände bereits seit Jahrzehnten in großen Mengen nach Europa eingeführt werden, so wurden sie auch schon sehr oft zum Gegenstand nicht nur der chemischen, sondern auch der bakteriologischen Untersuchung gemacht. Pott (zitiert bei 47)[1]) gibt die mittlere Zusammensetzung der Sesamkuchen und -mehle wie folgt an:

Trockensubstanz 90 %.	N-haltige Stoffe . . .	46,4 %
	N-freie Extraktstoffe .	26,6 %
	Rohfett	2,4 %
	Holzfaser	2,7 %
	Asche	10,8 %

Von den stickstoffhaltigen Bestandteilen und vom Rohfett sollen rund 90 Proz. verdaulich sein. Die Rückstände der Sesamölbereitung müssen also, wie die Erdnußfuttermittel, ein recht vorzügliches Kraftfutter darstellen. Diese Annahme wurde auch in der Praxis schon vielfach bestätigt.

Die Versuche von Moser, Peter und Käppeli (100) ergaben, daß bei mäßiger Sesamfütterung an Kühe eine bedeutende Steigerung des Milchertrages erzielt werden kann. Ähnliche Resultate erhielten Ramm und Mintrop (108). Neben den praktischen Fütterungsversuchen setzte auch die bakteriologische Forschung, allerdings nur in bescheidenem Umfange, ein. Malkoff (95) isolierte ab der frischen Sesampflanze zwei pathogene Bakterien, die er als Bacillus Sesami (gelbe Kolonien) und Pseudomonas Sesami (graue Kolonien) bezeichnete. Ziemlich eingehende

---

[1]) Siehe Literaturverzeichnis am Schlusse der Arbeit.

Untersuchungen stellten König und Spieckermann (81) mit Sesamfuttermitteln an. Sie wiesen nach, daß die Bakterienflora des Materials je nach Luftzufuhr, nach der Zusammensetzung des Sesammehles und nach dessen Feuchtigkeitsgrad sehr verschieden sei. Wurde das Sesammehl nicht angefeuchtet, so entwickelten sich besonders die Schimmelpilze, wurde die Versuchsprobe aber befeuchtet, so gewannen sofort die Bakterien die Oberhand. Bei mäßiger Luftzufuhr entwickelten sich in der ersten Woche des Versuches vor allem die zuckerzersetzenden Arten, besonders das Bact. coli und zuckervergärende Kokken; ferner in bedeutender Menge mehr indifferente Fluoreszierende. Die Reaktion des Versuchsmaterials wurde sauer. — In der zweiten Woche gewannen allmählich die Kartoffelbazillen und die Buttersäurebakterien die Oberhand; später setzten die Proteïnzerstörer ein, das Material wurde nun alkalisch und nach 4 Wochen war der Geruch desselben typisch faulig. Der ganze Zersetzungsvorgang mußte also von den Autoren als ein ausgesprochener metabiotischer Prozeß bezeichnet werden, wie wir dies auch bei Kleie und Erdnuß feststellen konnten.

Wurde angefeuchtetes Sesammaterial halb anaërob (in einem 25 cm hohen Becherglas) aufbewahrt, so veränderte sich makroskopisch nur die oberste Schicht in bedeutenderem Maße. Das Material überzog sich mit einer Schimmeldecke und es machte sich eine bedeutende Ammoniakentwicklung geltend. Die tieferen Schichten aber blieben Monate lang hellgelblich und sauer reagierend.

Bei Aufbewahrung unter gänzlichem Luftabschluß fand nur sauere Gärung statt, wodurch ein Übergang zur Fäulnis verhindert wurde.

Außer den genannten Forschern haben sich auch Heinrich (63), Weigmann (129), Hebebrand (61) und andere mehr mit der Untersuchung von Sesam beschäftigt. Im allgemeinen aber wurde auch hier, wie bei den anderen Futtermitteln, der chemischen Forschung das Hauptaugenmerk zugewendet.

Was die Untersuchungsmethoden betrifft, so gibt Heinrich [1]) folgendes Verfahren an: In sterilem Tiegel werden ca. 50 g Material zerrieben, dann je 0,5 g steril abgewogen und in sterilen Kölbchen mit 20 g keimfreiem Wasser tüchtig umgeschüttelt. Nach ½ Stunde wurde $^1/_{20}$ ccm von der so hergestellten Aufschwemmung in Gelatineplatten geimpft, und nach 2 bis 3 Tagen wurden die entwickelten Kolonien gezählt. Auf diese Weise fand der Verf. pro Gramm Sesamkuchen 250 000—675 000 Bakterien, von denen 158 000 bzw. 294 800 die Gelatine verflüssigten. Eine weitere Bestimmung der Arten nahm Verf. nicht vor.

Unsere Untersuchungsweise ist von der eben beschriebenen eine wesentlich abweichende. Es wurden genau 2 g des zu untersuchenden gut durchmischten Materials steril abgewogen und mit 20 ccm sterilem Wasser zu einem ganz feinen Brei in ausgeflammtem Tiegel zerrieben. Hierauf wurden in den gebräuchlichen, keimfreien Verdünnungskölbchen dezimale Verdünnungen hergestellt, wie dies im allgemeinen Teil dieser Arbeit p. 4 ff. eingehend beschrieben wurde.

Beim frischen Material bewährten sich als günstigste Nährböden: Gewöhnliche Nährgelatine und Milchzuckeragar für die Plattenkulturen, sowie Milchzuckeragar für die hohe Schichtkultur. Beim gärenden Material trat an Stelle der gewöhnlichen Nährgelatine die Molkengelatine.

---

[1]) Heinrich, R., II. Bericht der landw. Versuchsstation Rostock 1894.

Im ganzen wurden 13 Proben von Sesammehlen und 11 Proben von Sesamkuchen untersucht. Zwei Proben (1 Mehl und 1 Kuchen) wurden ganz eingehend, analog wie bei Kleie und Erdnuß, behandelt. Je eine Kuchen- und eine Mehlprobe wurden angefeuchtet in 12 verschiedenen Gärstadien bei 20°, in Zeiträumen von je 12 zu 12 Stunden auf Zahl und Art der vorhandenen Spaltpilze geprüft. Bei einer weiteren Sesammehlprobe wurde der Einfluß des verschiedenen Wassergehaltes resp. Wasserzusatzes auf die Entwicklung der Bakterienflora ermittelt, und der Rest der Proben gelangte nur in frischem Zustande zur Untersuchung. — Betreffend Übersicht der Verarbeitung der nun hier zunächst folgenden eingehenden Untersuchungen wird auf p. 97 verwiesen.

Sesammehlproben.

2. Eingehende Untersuchung von Sesammehlprobe A.

a) Das Material in frischem und gärendem Zustande.

Die Probe stammt von der Futtermittelhandlung A. M. in Lausanne und ging durch gefällige Vermittlung von Herrn A. T. am 3. März 1910 ein. Aussehen der Probe normal. Verarbeitung am 8. März 1910 nach üblicher Methode.

Zusammenfassung der Untersuchungsresultate[1]

(vom 15. März 1910).

Die in Verdünnungen von $^1/_{100}$—$^1/_{100\,000}$ angelegten Kulturen wurden nach vollständiger Entwicklung aller Arten auf übliche Weise untersucht.

Sesammehl A frisch.

Bakterienart	Keimzahlen pro g	
	absolut	%
Bacillus mesentericus	4 000	3
Bacillus megatherium	2 000	2
Bacillus tumescens	3 000	2
Bacillus oxalaticus	2 000	2
Bacterium fluorescens	5 000	4
Bacterium putidum	2 000	2
Bacterium levans	6 000	5
Bacterium herbicola aureum	2 000	2
Bacterium herbicola rubrum	1 000	1
Bacterium coli	2 000	2
Gelber Gasbildner	1 000	1
Torulaspezies mit grauen Kolonien	4 000	3
Unbewegliche Kurzstäbchen, verflüssigend	15 000	12
„ „ , nicht verflüssigend	20 000	16
Bewegliche Kurzstäbchen, verflüssigend	10 000	8
„ Langstäbchen, „	23 000	19
Langstäbchen, nicht verflüssigend, Kolonien mit gezähntem Rand	10 000	8
Langstäbchen, nicht verflüssigend, Kolonien mit gelapptem Rand	4 000	3
Diverse Kokken	6 000	5
Gesamtzahl	122 000	100

---

[1] Wir werden in diesem Teile, der Kürze halber, die gefundenen Keimzahlen auf den 3 verschiedenen Nährböden nicht gesondert anführen, sondern nur zusammenfassend die ermittelten Gesamtzahlen mit dem prozentuellen Anteil der einzelnen Spezies angeben.

Was die absolute Zahl der Bakterien in der frischen Sesammehlprobe A betrifft, so muß fast von einer relativen Keimarmut gesprochen werden. Heinrich fand die doppelte bis sechsfache Menge pro Gramm vor. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß Probe A eine der keimärmsten der untersuchten Mehlproben ist; spätere Proben wiesen in der Regel einen bedeutend höheren Bakteriengehalt auf; in Ausnahmefällen sogar die 10-fache Keimzahl.

Auffallend groß ist in vorstehender Probe die Zahl der Peptonisierenden. Rund 50 Proz. der gefundenen Keime erwiesen sich als gelatineverflüssigend. Es sind in der Großzahl schlanke, in der Literatur nicht beschriebene Stäbchen, die wir nicht weiter verfolgen konnten. — Die Fluoreszierenden sind mit 6 Proz. relativ schwach vertreten; ebenso die typischen Gasbildner. Der Gesamtbestand der Bakterienflora von Sesammehlprobe A muß als ein sehr komplizierter bezeichnet werden.

Sesammehl A, angefeuchtet, in gärendem Zustande.

Serie 1.

Sesammehl A, angefeuchtet, bei 37° C aufbewahrt.

Am 7. März 1910 wurden vom Erdnußmehl A 3 Proben von je 40 g steril abgewogen und mit der doppelten Menge sterilen Wassers tüchtig vermischt. Die so hergestellten Proben wurden zu 37° C verbracht und je eine derselben nach Verlauf von 24 Stunden, 48 Stunden und 5 Tagen als Probe S I a, bzw. S I b, bzw. S I c bakteriologisch analysiert. Näheres über die Untersuchungsmethode siehe p. 10 ff.

Untersuchungsresultate.

Makroskopischer Befund:

S I a. Mäßige Gasbildung, Material oberflächlich bräunlich bis schwärzlich verfärbt, Masse im Innern gelblich, Geruch nach dem Umrühren schwach säuerlich.

S I b. Deutliche Anzeichen der Gasbildung, Verfärbung wie bei S I a, nur intensiver; lokale Wucherung von Streptothrix chromogena, daneben schwacher Mucoranflug, Geruch ausgesprochen säuerlich, schwache Ammoniakdämpfe treten auf.

S I c. Oberfläche ganz dunkelbraun verfärbt, lokale Wucherung einer dem Bac. mesentericus ähnlichen Masse, deutliche Ammoniakdämpfe, Geruch sauer.

Mikroskopischer Befund
(Zahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	S I a		S I b		S I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	8	—	18	—	370	21
Bacterium coli	14	—	18	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	100	1	16	—	20	1
Bacterium Güntheri	11 000	99	9600	99	500	29
Gelber Gasbildner	—	—	52	1	20	1
Gelber Säurebildner	—	—	—	—	780	45
Verflüssigende Kokken . . .	—	—	—	—	40	3
Gesamtzahlen	11 122	100	9704	100	1730	100

Aus diesem Befund geht folgendes hervor; hinsichtlich:

Keimzahlen: Die Zahl der Keime ist von 122 000 im frischen Sesammehl auf 11 122 Millionen im 24 Stunden alten Material gestiegen, hat also eine Zunahme von rund ums 91 164-fache erfahren. Wie die Probe S Ib zeigt, setzte aber sehr bald wieder ein bedeutendes Zurückgehen der Keimzahl ein, denn die 48 Stunden alte Probe weist „nur" noch das 79 541-fache der im frischen Material nachgewiesenen Keime auf, und nach 5 Tagen ist die bezügliche Zahl sogar auf 14 180 gesunken. Es bestätigt sich somit auch hier die schon bei der Kleie und den Erdnußfuttermitteln gemachte Erfahrung, daß bei 37° C die Keimzahl äußerst rapid anwächst, jedoch bald auf dem Kulminationspunkt angelangt ist und dann rasch wieder abnimmt.

Arten: Auch in bezug auf die Arten hat sich im gärenden Material innerhalb kürzester Zeit ein ganz gründlicher Wechsel vollzogen. Von den 19 im frischen Sesammehl anwesenden Spezies war nach 24 Stunden nur noch ein verschwindend kleiner Rest von Bacillus mesentericus und Bacterium coli vorhanden, die zusammen nicht einmal $^1/_8$ Proz. der nunmehrigen Keimzahl erreichten. Alle übrigen Arten sind von den Säurebildnern, speziell von Bacterium Güntheri, das volle 99 Proz. der Mikroflora einnimmt, gänzlich unterdrückt worden. Die gleiche Erscheinung zeigt sich bei dem 48 Stunden alten Material. Doch vermögen sich nach und nach noch einige weitere Arten in bescheidenem Maße Geltung zu verschaffen, und nach 5 Tagen ist das Bact. Güntheri schon auf 29 Proz. zurückgegangen. Auffallend ist bei diesem Wechsel, daß der sonst säurefliehende Bacillus mesentericus neben dem Bacterium Güntheri in so großer Zahl aufzukommen vermochte. Die Erklärung für diese sonst seltene Erscheinung liegt wohl in dem Umstande, daß sich mit fortschreitender Gärung die säureverzehrenden Schimmelpilze in beträchtlichem Umfange entwickelten und daß das Bacterium Güntheri, infolge des langen Aufenthaltes unter ungünstigen Lebensbedingungen im Sesammehl, das Säureproduktionsvermögen stark reduziert hatte. Tatsächlich bewies ein angestellter Versuch, daß die erste Generation einer Reinkultur des Organismus die Milch nur unvollständig und erst nach längerer Zeit zur Gerinnung zu bringen vermochte, während sich das Säurebildungsvermögen nach einer größeren Anzahl von Generationen wieder ganz offenkundig zu regenerieren begann.

Serie 2.

Sesammehl A, angefeuchtet, bei 22° C.

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie üblich. Untersuchung derselben nach 24 Stunden, bzw. 48 Stunden, bzw. 5 Tagen.

Benennung und makroskopisches Aussehen:

Probe S IIa = 24 Stunden bei 22° C. Aussehen ziemlich unverändert, Gasbildung kaum bemerkbar, Geruch noch normal, nicht säuerlich.

Probe S II b = 48 Stunden bei 22° C. Ganze Masse schwach ockergelblich verfärbt, Geruch säuerlich, schwache Gasbildung, deutlich wahrnehmbare Ammoniakdämpfe.

Probe S II c = 5 Tage bei 22° C. Gasbildung kaum mehr bemerkbar, Ammoniak leicht wahrnehmbar, Geruch deutlich säuerlich.

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Das Anwachsen der Keimzahl ist bei 22° C nicht so rasch erfolgt, wie bei 37° C, aber auch hier macht sich schon im Verlaufe des zweiten Tages der Gärung eine starke Keimzahlreduktion geltend, welche bis zum fünften Tage zwar langsam, aber ununterbrochen fortschreitet.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Mikroskopischer Befund
(Zahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	S II a		S II b		S II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium . . .	—	—	100	4	—	—
Bacillus mesentericus. . . .	10	—	4	—	110	10
Bacillus subtilis	—	—	—	—	60	5
Bacterium fluorescens . . .	—	—	100	4	120	11
Bacterium coli	—	—	300	13	60	5
Bacterium acidi lactici . . .	10	—	500	21	180	16
Bacterium Güntheri	5200	89	1400	58	430	39
Gelber Gasbildner	20	—	—	—	70	6
Gelber Säurebildner	30	1	—	—	20	2
Gelbliche Rosettenkolonie. .	50	1	—	—	—	—
Kurze Doppelstäbchen (Säureb.)	520	9	—	—	—	—
Schlankere Stäbchen (Säureb.)	—	—	—	—	70	6
Gesamtzahlen	5840	100	2404	100	1120	100

Wie bei 37° C, so ist die Bakterienflora auch bei 22° C von jener des frischen Materials sehr verschieden. Ein massenhaft auftretendes säurebildendes Stäbchen nimmt nach Verlauf von 24 Stunden den weit überwiegenden Teil der Keime ein. Dieses Stäbchen erwies sich bei näherer Prüfung als ein typisches Bacterium Güntheri. Auch nach 2 Tagen hat das Bact. Güntheri noch entschieden die Oberhand. Im weiteren Verlaufe der Gärung jedoch treten wieder die Gasbildner mehr hervor. Die Mesentericus-subtilis-Gruppe vermag trotz der 60 Proz. Keime aus der Gruppe der Milchsäurebakterien in Probe S II c auf 15 Proz. anzusteigen. Das Bacterium fluorescens nimmt mit fortschreitender Zersetzung des Gärmaterials prozentuell immer mehr zu.

b) Wirkung von Sesammehl A, frisch und in verschiedenen Gärstadien, auf gewöhnl. Konsummilch.

Untersuchung der frischen Konsummilch selbst.

Die Milch wurde am 8. März 1910 auf dem Gute „Strickhof“ bei Zürich abgeholt und ca. eine Stunde nach dem Melken auf die üblichen Nährböden verarbeitet. Zugleich wurde die für die folgenden Untersuchungen notwendige Zahl von Erlenmeyerkölbchen mit je 100 ccm der Milch in früher beschriebener Weise beschickt und dann mit frischem und gärendem Material in den verschiedenen Stadien geimpft.

Die Untersuchung der frischen Milch selbst ergab folgendes Resultat:

Bakterienart	Gesamtzahl auf den 3 Nährböden pro ccm	
	absolut	%
Bacterium fluorescens	3 000	2
Bacterium putidum	1 000	1
Bacillus mesentericus	1 000	1
Streptococcus in grauen Kolonien	10 000	7
Diplococcus in gelblichen Kolonien	3 000	2
Diplococcus in grauen Kolonien	90 000	61
Staphylococcus in grauen Kolonien	5 000	3
Unbewegliches, sporenloses Kurzstäbchen . .	2 000	1
Bacterium coli	1 000	1
Bacterium acidi lactici	2 000	1
Bacterium Güntheri	30 000	20
Gesamtzahl	148 000	100

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Die frische Milch weist also einen unverhältnismäßig niederen Keimgehalt auf. Die Hauptmenge bilden die Kokken mit 73 Proz. der gesamten Keimzahl. Sie stammen, wie schon von vielen Forschern nachgewiesen wurde, zum größten Teil aus dem Euter selbst, sind aber fast immer harmloser Natur. In der Milch selbst vermehren sie sich nicht, oder doch nur in ganz beschränktem Maße, da sie unter gewöhnlichen Verhältnissen regelmäßig von Bacterium Güntheri überwuchert werden. Das Bact. Güntheri macht in vorstehender Probe schon einen ausnahmsweise hohen Prozentsatz, genau $^1/_5$ des Keimgehaltes, aus.

Serie 3.

Kontrollmilchproben.

Zur Gewinnung derselben wurde von der oben untersuchten Milch verwendet. 3 Proben wurden zu je 100 ccm in sterilisierte Erlenmeyerkölbchen abgemessen, als K a, K b und K c bezeichnet und zu 37° C, bzw. 22° C, bzw. 12° C gestellt. Die mikroskopische Untersuchung fand jeweils statt, sobald eine makroskopische Veränderung wahrgenommen werden konnte.

Untersuchungsergebnisse:

9. März 1910 K a = Kontrollmilch bei 37° C: Nach 18 Stunden deutlich verändert, Rahmdecke intakt, Gasbildung kaum wahrnehmbar, breite, milchig getrübte Serumzone, Koagulum von feinflockiger Beschaffenheit, Geruch säuerlich, etwas nach Molke, Geschmack normal, mittelstark sauer, Säuregrad 11,7 n/10 NaOH.

K b = Kontrollmilch bei 22° C. Nach 42 Stunden ganz gleichmäßig gallertig geronnen, kein Gas, schmale Serumzone, Geschmack normal, angenehm sauer, Säuregrad 16,6 n/10 NaOH.

K c = Kontrollmilch bei 12° C. Nach 4 Tagen leicht gallertig geronnen, kaum sichtbare Serumzone, von Gas keine Spur. Geschmack ziemlich rein sauer. Säuregrad 16,7 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	K a		K b		K c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	10	2	—	—	—	—
Bacterium coli	2	—	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	2	—	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	480	98	3100	100	790	100
Gesamtzahlen	494	100	3100	100	790	100

Am schnellsten vollzog sich, wie gewöhnlich, die makroskopische Veränderung bei 37° C. Die Gärung war aber hier nicht eine so vollständig reine Milchsäuregärung, wie dies bei 22° C und 12° C der Fall war. Die Gasbildner und Bacillus mesentericus vermochten sich noch in ganz schwacher Vertretung zu behaupten. Bei 22° C und bei 12° C, wo die makroskopische Veränderung erheblich später eintrat, fand sich eine vollständige Reinkultur des Bacterium Güntheri.

Serie 4.

Konsummilch, geimpft mit frischem Sesammehl A.

Es wurden 3 Proben zu 100 ccm der Konsummilch mit je $^1/_{100}$ g des frischen Sesammehles in üblicher Weise geimpft und die geimpften Milchproben zu

37° C, 22° C und 12° C verbracht. — Benennung der Proben: M I, M II und M III.

Probe M I = frische Konsummilch, geimpft mit $^1/_{100}$ g frischem Sesammehl A; Probe zu 37° C gestellt. — Nach 18 Stunden makroskopisch verändert; starke Blähung, käsig-ziegerige Gerinnung, Rahm und Gerinnsel sehr stark emporgehoben und zusammen verklebt. Große Mengen grünlich-verfärbtes Serum, Geruch molkenartig, Geschmack mittelstark aber unrein säuerlich. Säuregrad 12,2 n/10 NaOH.

Probe M II = frische Konsummilch, geimpft mit Sesammehl A frisch; geimpfte Probe zu 22° C gestellt. — Nach 39 Stunden deutlich makroskopisch verändert; Milch gleichmäßig gallertig geronnen, kaum merkliche Gasbildung; das gesamte Bild der Probe entspricht ziemlich genau jenem der Kontrollmilch K b. Säuregrad 17,1 n/10 NaOH.

Probe M III = frische Konsummilch, geimpft mit frischem Sesammehl A; geimpfte Milch zu 12° C verbracht. — Nach 3½ Tagen makroskopisch verändert; Rahmdecke ganz glatt, schwache Oidienentwicklung, eine ca. 1 mm breite Serumzone ist bemerkbar, Geschmack stark sauer, deutlich bitter, Säuregrad 18,7 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I		M II		M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	—	—	10	1
Bacterium acidi lactici . . .	60	22	—	—	10	1
Bacterium Güntheri	200	71	700	100	720	98
Kokken	20	7	—	—	—	—
Gesamtzahlen	280	100	700	100	740	100

Ein Vergleich vorstehender Resultate mit jenen der Kontrollmilch zeigt uns:

a) Bei der mit frischem Sesammehl geimpften Milch ist bei 37° C eine frühere makroskopische Veränderung gegenüber der analogen Kontrollmilch nicht wahrzunehmen. Dagegen ist dies bei jener Probe der Fall, die bei 22° C aufbewahrt wurde. Bei 12° C ist die Haltbarkeit der Kontrollmilch ebenfalls um ½ Tag verlängert.

b) Die Keimzahl ist bei der geimpften Milch M I bedeutend kleiner. Sie betrug pro Kubikzentimeter 280 Millionen, während die ungeimpfte Milch 494 Millionen Keime aufwies, also um rund 76 Proz. bakterienreicher war. Noch größere Abweichungen zeigt uns der Vergleich der Proben bei 22° C. Die Milch M II enthielt pro Kubikzentimeter 700 Mill. Spaltpilze, die Kontrollprobe aber 3100 Millionen, also um 342 Proz. mehr. — Annähernd gleiche Keimzahlen weisen die bei 12° C aufbewahrten Milchproben auf, indem bei M III 740 Millionen, bei K c 790 Millionen Keime im Kubikzentimeter nachgewiesen werden konnten.

c) In bezug auf die qualitative Zusammensetzung der Flora ist vor allem bei 37° C eine große Abweichung festzustellen. Bei der geimpften Milch ist nämlich das Bacterium Güntheri zugunsten der Gasbildner stark zurückgedrängt worden. In der Kontrollprobe erreichte die genannte Art 98 Proz., in geimpfter Milch aber nur 71 Proz. der gesamten Keimzahl. — Bei 22° C ist eine Beeinflussung durch das Impfmaterial in qualitativer Hinsicht nicht, bei 12° C nur in ganz bescheidenem Maße festzustellen.

Besonders auffällig ist bei einem Vergleich der geimpften und nicht geimpften Proben die reduzierte Keimzahl der ersteren. Dieser Umstand muß zum Teil dem „Kampf ums Dasein", der sich offenbar zwischen der ursprünglichen Flora der Milch und den eingeimpften Arten abspielt, zum Teil auch der etwas verkürzten Gärdauer bei 22° C zugeschrieben werden.

Serie 5.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 1 Tag bei 37° C war.

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie üblich.

Benennung M I a = Geimpfte Milch zu 37° C verbracht
M I b = „ „ zu 22° C „
M I c = „ „ zu 12° C „

M I a: Nach Verlauf von 18 Stunden ist bedeutende Gasbildung wahrnehmbar, Milch unregelmäßig, feinflockig-gallertig geronnen, große Menge milchig getrübtes Serum vorhanden, Geschmack unrein säuerlich, Säuregrad 12,5 n/10 NaOH.

M I b: Nach 36 Stunden ganz gleichmäßig gallertig geronnen, keine Spur von Gas, Geruch und Geschmack stark, aber rein sauer; Säuregrad 16,8 n/10 NaOH.

M I c: Nach 4 Tagen keine Gasbildung, schwacher Oidienanflug, Gerinnung ganz feinflockig-gallertig; schmale, gelbliche Serumzone, Geschmack stark sauer mit Stich ins Bittere; Säuregrad 17,0 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	2	—
Bacterium acidi lactici . . .	80	26	—	—	11	1
Bacterium Güntheri	130	42	560	100	1150	99
Gelber Gasbildner	60	19	—	—	—	—
Gelber Säurebildner	40	13	—	—	—	—
Gesamtzahlen	310	100	560	100	1163	100

In bezug auf die Vertretung der einzelnen Arten hat sich eine große Verschiebung vollzogen, indem das im Impfmaterial mit 99 Proz. nachgewiesene Bacterium Güntheri in der Milch bei 37° C auf 42 Proz. zurückging. Dagegen sind die Gasbildner relativ von 1 auf 45 Proz. und absolut um rund das 9722-fache angestiegen.

Bei 22° C hat sich das Bacterium Güntheri, wie immer, die Alleinherrschaft errungen. Bei 12° C erweist sich die Gärung wieder mehr als eine gemischte. Die Wirkung des Impfmaterials auf die Bakterienflora der Milch tritt also auch in Serie 5 bei 37° C am weitaus deutlichsten hervor.

Serie 6.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war.

Vorprüfung und mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Herstellung, Impfung und Verarbeitung der Proben wie üblich.

Gegenüber der Kontrollmilchprobe weist M II a einen vermehrten Bakteriengehalt auf und zwar rund 56 Proz. Qualitativ aber ist keine deutliche

Differenz wahrzunehmen. Probe M II b erweist sich, wie die zugehörige Kontrollmilch, als eine förmliche Güntherireinkultur; besonders auffallend ist der große Prozentsatz von Bact. Güntheri bei 12° C und die dort zu beobachtende große Keimmenge.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M II a	M II b	M II c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Zeit bis zur makr. Veränderung	18 Stunden	38 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	feinflockig geronnen, schwache Gasbildung	gleichmäßig gallertig geronnen	gallertig geronnen, kein Gas
Geschmack	normal sauer	normal sauer	unrein sauer
Säuregrad	13,3 n/10 NaOH	17,0 n/10 NaOH	17,2 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M II a		M II b		M II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	10	1	—	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	100	4
Bacterium acidi lactici . . .	10	1	—	—	1	—
Bacterium Güntheri	750	98	790	100	2400	96
Gesamtzahlen	770	100	790	100	2501	100

Serie 7.

Frische Konsummilch geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M III a	M III b	M III c
Aufbewahrungstemperatur . .	37° C	22° C	12° C
Gärzeit	17 Stunden	36 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	Blähung, käsig geronnen	normal gallertig geronnen, schwach Gas	schwach gallertig geronnen
Geschmack	normal sauer	normal sauer	unrein sauer
Säuregrad	13,5 n/10 NaOH	18,2 n/10 NaOH	17,4 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M III a		M III b		M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	2	—
Bacterium acidi lactici . . .	20	2	20	3	11	1
Bacterium Güntheri	1100	96	680	97	1150	99
Sproßpilz	20	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1140	100	700	100	1163	100

Die Haltbarkeit der Milch erscheint bei 37° C durch die Impfung merklich beschränkt. Qualitativ trat gegenüber den Kontrollproben eine Begünstigung der Gasbildner ein. Auch in quantitativer Beziehung ist ein bedeutender Unterschied zwischen den geimpften und den ungeimpften Proben festzustellen.

Die Bakterienzahl pro Kubikzentimeter betrug z. B. bei Probe III a 1140 gegenüber 494 Millionen in der bezüglichen Kontrollmilch. — Bei 22° ist eine nennenswerte Einwirkung durch die Impfung nicht festzustellen, weil die genannte Temperatur dem Wachtumsoptimum von Bacterium Güntheri näher liegt, als demjenigen der Gasbildner. Auch bei der zu 12° C verbrachten Milchprobe zeigt sich die Einwirkung der Impfung ebenfalls in recht bescheidenem Maße. Wie in den Kontrollproben, so überwiegt naturgemäß in allen geimpften Milchproben das Bacterium Güntheri, das schon im Impfmaterial selbst in ganz ansehnlicher Zahl vorhanden war. Erwähnenswert ist die relativ geringe Keimzahl bei 22° C.

Serie 8.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M IV a	M IV b	M IV c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	40 Stunden	3½ Tage
Makroskopisches Aussehen	starke Blähung, käsig-ziegerig geronnen	gleichmäßig gallertig geronnen	etwas Gas, Gerinnung gallertig
Geschmack	unrein sauer	normal sauer	stark sauer, bitterer Nachgeschmack
Säuregrad	11,6 n/10 NaOH	17,8 n/10 NaOH	17,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IV a		M IV b		M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	10	—	20	2
Bacterium coli	—	—	1	—	—	—
Bacterium acidi lactici	57	21	3	—	40	3
Bacterium aërogenes	—	—	1	—	30	2
Bacterium Güntheri	209	78	900	1	1120	93
Unbewegliches, unbekanntes Kurzstäbchen1)	—	—	120 000	99	—	—
Gelber Gasbildner	2	1	—	—	—	—
Gesamtzahlen	268	100	120 915	100	1210	100

Die Einwirkung des Gärmaterials ist vor allem bei 37° C eine augenscheinliche. Ein Vergleich mit der analogen Kontrollprobe zeigt uns, daß die Gasbildner verhältnismäßig stark hervortreten, was auch schon makroskopisch am ausgesprochenen Blähungstypus der Milch sicher anzunehmen war.

Eine bisher noch nie erreichte Keimzahl weist die Probe M IV b auf. Während das typische Bacterium Güntheri auf den Plattenkulturen in einer normalen Zahl von 900 Millionen vertreten war, zeigt die hohe Schichtkultur eine Unmasse von kleinen, schlanken, unbeweglichen, stark zur Anaerobiose hinneigenden, säurebildenden Kurzstäbchen, die in den Plattenkulturen nicht nachweisbar waren. Die Dimensionen betrugen 1—1,5 × 0,4—0,5 μ.

---

1) **Erwies sich beim näheren Verfolgen als Bacterium Güntheri.**

Der hohe Säuregrad der Milch ließ auf einen starken Säurebildner schließen. Der Organismus wurde näher verfolgt. Am 22. März 1910 wurde von demselben eine größere Zahl von Kulturen, besonders hohe Schichtkultur und Stiche von Milchzuckeragar gemacht. Das Wachstum dieses „Pseudo-Güntheri“ war, wenn vorerst auch nicht üppig, so doch ganz befriedigend. Schon nach der zweiten Überimpfung am 8. April wiesen fast alle Kulturen ganz übereinstimmend bedeutend Güntheri ähnlichere Formen auf und am 30. April war das ehemalige ziemlich schlanke Kurzstäbchen in eine typische Form des Bacterium Güntheri übergegangen. Wir fanden also in Verfolgung dieser in Serie 8 massenhaft auftretenden Formen die Angaben Müllers[1]), daß das Bacterium Güntheri auch als ausgeprägte Kurzstäbchenform vorkomme, aufs deutlichste bestätigt.

Serie 9.

Frische Konsummilch geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C aufbewahrt wurde.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben nach bekannter Methode.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M V a	M V b	M V c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	37 Stunden	3 Tage
Makroskopisches Aussehen	stark gebläht, käsig geronnen	gallertig geronnen, kein Gas	gallertig geronnen, schwache Oidiendecke
Geschmack	ziemlich normal sauer	unrein sauer	stark sauer u. stechend bitter
Säuregrad	11,9 n/10 NaOH	17,0 n/10 NaOH	20,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	10	2	40	4
Bacterium acidi lactici	8	2	1	—	20	2
Bacterium aërogenes	2	1	1	—	4	1
Bacterium Güntheri	360	97	410	93	800	83
Kokken	—	—	—	—	100	10
Bacillus putrificus coli	—	—	20	5	—	—
Gesamtzahlen	370	100	442	100	964	100

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe decken sich im allgemeinen mit jenen der vorhergehenden: Die Einwirkung des Impfmaterials macht sich nur schwach und hauptsächlich im Hervortreten einer vermehrten Gasbildnerentwickelung geltend. Nur bei der Milchprobe M V b erscheint durch das Impfmaterial der Bacillus putrificus coli eingeschleppt worden zu sein. In der bei 12° C aufgestellten Probe wurden die Fluoreszierenden durch die Beigabe von gärendem Sesammehl begünstigt, während dem das Bacterium Güntheri etwas zurückgegangen ist.

---

[1]) Siehe p. 156; Fußnote.

Serie 10.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war.

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M VI a	M VI b	M VI c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	38 Stunden	4 Tage
Makroskopisches Aussehen	Blähung, käsig geronnen	etwas Gas, gleichmäßig gallertig geronnen	gallertig geronnen
Geschmack	unrein sauer	rein sauer	sauer und bitter
Säuregrad	13,4 n/10 NaOH	17,0 n/10 NaOH	19,4 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M VI a		M VI b		M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	—	—	22	—	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	50	—	10	—
Bacterium coli	2	—	200	2	10	—
Bacterium acidi lactici	11	2	800	7	20	1
Bacterium aërogenes	7	1	30	—	—	—
Bacterium Güntheri	500	97	10 600	89	3400	99
Gelber Gasbildner	—	—	200	2	—	—
Gesamtzahlen	520	100	11 902	100	3440	100

Entsprechend der komplizierten Zusammensetzung des Impfmaterials ist auch die Bakterienflora in vorstehenden Milchproben nicht so einheitlich, wie bei den Proben der Serien 4—9. Im allgemeinen ist unter gewohnter, sehr starker Vertretung von Bacterium Güntheri die qualitative Zusammensetzung der einzelnen Proben von Serie 10 ein ziemlich getreues Abbild der Mikroflora des für diese Proben verwendeten Impfmaterials. Letzteres weist 9 verschiedene Bakterienarten auf, von welchen nun 6 in der geimpften, bei 22° C aufbewahrten Milchprobe, wenn auch in ganz anderen quantitativen Verhältnissen, zur Entwicklung gelangt sind.

c) Wirkung von Sesammehl A, in frischem und gärendem Zustande, auf sterile Milch.

Serie 11.

Sterile Milch, geimpft mit frischem Sesammehl A.

Über Herstellung der sterilen Milch siehe p. 12. Jede der 3 Proben à 100 ccm sterile Milch wurde mit je $^{1}/_{100}$ g frischem Sesammehl A geimpft.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S M I	S M II	S M III
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	44 Stunden	5½ Tage
Makroskopisches Aussehen	starke Blähung, käsig geronnen	feinflockig bis gallertig geronnen, Gas	ganz feinflockig geronnen, wenig Gas
Geschmack	säuerlich-bitter	säuerlich, stark bitter	säuerlich-bitter
Säuregrad	8,8 n/10 NaOH	7,2 n/10 NaOH	13,2 n/10 NaOH

Keimzahlen in Millionen pro ccm.

Bakterienart	S M I		S M II		S M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium . . .	16	5	—	—	—	—
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	—	—	50	1
Bacterium fluorescens . . .	—	—	70	8	800	23
Bacterium putidum	—	—	30	4	500	14
Bacterium coli	6	2	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	15	4	100	12	70	2
Bacterium aërogenes	100	28	10	1	—	—
Bacterium Güntheri	220	61	400	47	2100	59
Gelber Gasbildner	—	—	200	24	25	1
Gelber Säurebildner	—	—	30	4	—	—
Gesamtzahlen	357	100	840	100	3545	100

Von den im frischen Impfmaterial nachgewiesenen 19 Spaltpilzarten haben sich in der geimpften Milch bei 37° C nur der Bacillus megatherium und Bacterium coli in bescheidener Menge entwickelt. Es hat also eine scharfe Auslese stattgefunden. Die für den sichern Nachweis im frischen Sesammehl in zu kleinen Mengen vorhandenen übrigen Arten, vor allem die Milchsäurebakterien, haben die tonangebende Ursprungsflora ganz zurückgedrängt. — Etwas weniger stark dezimiert, bzw. etwas besser zu entwickeln, vermochte sich diese Ursprungsflora bei 22° C und bei 12° C. Im ersteren Falle waren noch 3 im Impfmaterial nachgewiesene Arten in der Milch in bedeutender Menge nachweisbar. Der gelbe Gasbildner, der im frischen Sesammehl mit nur 1000 Keimen pro Gramm vertreten war, nimmt nun in der Milch sogar 24 Proz. der Gesamtkeimzahl ein. — Bei 12° C haben 4 Spezies der Ursprungsflora in der sterilen Milch eine ansehnliche Vermehrung erfahren. Bei allen 3 Milchproben jedoch erreichen die nichtgasbildenden Milchsäurebakterien das entscheidende Übergewicht und im allgemeinen muß die Bakterienflora der geimpften, makroskopisch veränderten „sterilen" Milch als bedeutend komplizierter bezeichnet werden, als die analogen, mit gleichem Impfmaterial geimpften Konsummilchproben.

Serie 12.

Sterile Milch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war.

Herstellung der Proben und Untersuchung der Kulturen wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S M I a	S M I b	S M I c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	14 Stunden	46 Stunden	8 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	stark gebläht, kompakt käsig geronnen	viel Gas, feinflockig geronnen	Gas, gallertig geronnen
Geschmack	unrein säuerlich	säuerlich, bitterer Nachgeschmack	unrein säuerlich
Säuregrad	9,2 n/10 NaOH	9,1 n/10 NaOH	13,2 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Da das Impfmaterial 99 Proz. an Bacterium Güntheri und 1 Proz. an Bacterium acidi lactici, neben untergeordneten

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	SM Ia		SM Ib		SM Ic	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	—	—	100	3
Bacterium coli	20	3	—	—	600	15
Bacterium acidi lactici . . .	80	13	700	53	2200	55
Bacterium aërogenes	30	5	130	10	—	—
Bacterium Güntheri	370	62	400	30	900	22
Gelber Gasbildner	90	15	100	7	200	5
Bacterium levans	10	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	600	100	1330	100	4000	100

Mengen von Bacillus mesentericus und Bacterium coli enthielt, so kann obige Flora qualitativ als einigermaßen übereinstimmend mit jener des Impfmaterials bezeichnet werden; denn beiderorts sind es die Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien, welche die Hauptrolle spielen. Quantitativ dagegen hat eine große Verschiebung zugunsten der Gasbildner innerhalb der erwähnten Gruppe stattgefunden. Bei 22° C und bei 12° C ist besonders das Bacterium acidi lactici in sonst ungewohnter Weise stark hervorgetreten. Bei 37° C und bei 22° C vermochte sich ferner auch das Bacterium aërogenes sehr bedeutend zu entwickeln. Noch mehr aber ist der gelbe Gasbildner hervorgetreten, der im Impfmaterial in einer für den Nachweis nicht genügenden Zahl vorhanden war. Die Bakterienflora dieser Serie muß also als eine mehr oder weniger ausgesprochene Gasbildnerflora bezeichnet werden.

Serie 13.

Sterile Milch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	SM IIa	SM IIb	SM IIc
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	44 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	kompakt käsig geronnen, Gas	Gas, Gerinnung feinflockig-gallertig	gallertig geronnen,
Geschmack	säuerlich mit bitterem Nachgeschmack	säuerlich, schwach bitter	unrein säuerlich
Säuregrad	10,9 n/10 NaOH	11,1 n/10 NaOH	11,6 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	SM IIa		SM IIb		SM IIc	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	40	3	60	5	—	—
Bacterium coli	30	2	30	2	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	220	17	320	24	1800	62
Bacterium Güntheri	900	70	800	60	1100	38
Gelber Gasbildner	100	8	120	9	—	—
Gesamtzahlen	1290	100	1330	100	2900	100

Qualitativ ist zwischen der Bakterienflora des Impfmaterials und jener obiger Milchproben kein bemerkenswerter Unterschied. Ausnahmsweise sind hier bei 37° C und bei 22° C alle durch das gärende Sesammehl übertragenen Arten zur Entwicklung gelangt, allerdings in ganz anderer prozentueller Verteilung als im Impfmaterial. Denn dort macht z. B. das Bacterium Güntheri 99 Proz. des Bestandes aus, hier aber nur 70, bzw. 60, bzw. 38 Proz. Dagegen sind die Gasbildner im umgekehrten Verhältnis angewachsen. Vorstehende Serie liefert daher auch wieder den Beweis, daß das Bacterium Güntheri in gewöhnlicher Konsummilch weit bessere Existenzbedingungen findet, als in sterilisierter Milch. Die Gasbildner jedoch sind in dieser Beziehung viel weniger anspruchsvoll.

Serie 14.

Sterile Milch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war.

Herstellung der sterilen Milch, Impfung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S M III a	S M III b	S M III c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	44 Stunden	7½ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	stark gebläht, kompakt geronnen	etwas Gas, feinflockig-gallertig geronnen	Gas, ganz feinflockig geronnen
Geschmack	sauer, deutlich bitter	widerlich-säuerlich-bitter	unrein, kaum ausgeprägt sauer
Säuregrad	11,1 n/10 NaOH	10,7 n/10 NaOH	11,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M III a		S M III b		S M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus megatherium . . .	10	1	—	—	—	—
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	20	1	—	—
Bacterium coli	200	13	120	3	200	5
Bacterium acidi lactici . . .	300	20	230	6	800	20
Bacterium Güntheri	900	58	3600	90	2900	75
Gelber Gasbildner	30	2	—	—	—	—
Gelber Säurebildner	100	6	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1540	100	3970	100	3900	100

Im Vergleich zu den Parallelkulturen der gewöhnlichen Konsummilch zeigt sich in allen 3 Proben vorstehender Versuche deutlich die Tendenz der Zurückdrängung des nichtgasbildenden Milchsäurebakteriums zugunsten der Gasbildner. Von den hier vorhandenen Arten waren im Impfmaterial alle mit Ausnahme des Bacillus megatherium und des Bacterium coli nachweisbar. Stark unterdrückt wurde der gelbe Säurebildner, da er im Impfmaterial mit 45 Proz., in der geimpften Milch aber nur mehr mit 6 Proz. und nur bei 37° C vertreten ist. Auch Bact. Güntheri ist bei 37° C relativ bedeutend im Rückstand geblieben, trat aber bei 22° C mehr hervor.

Serie 15.

Sterile Milch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war.

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S M IV a	S M IV b	S M IV c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17 Stunden	41 Stunden	3 ½ Tage
Makroskopisches Aussehen	kompakt gallertig geronnen, Gas	gallertig geronnen	gallertig geronnen, schwach Gas
Geschmack	säuerlich, schwach bitter	ziemlich rein sauer	säuerlich-bitter
Säuregrad	11,6 n/10 NaOH	15,1 n/10 NaOH	18,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M IV a		S M IV b		S M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	40	1	200	9
Bacterium putidum	—	—	20	1	—	—
Bacterium coli	50	6	30	1	—	—
Bacterium acidi lactici	180	20	60	2	200	9
Bacterium aërogenes	—	—	40	1	—	—
Bacterium Güntheri	600	68	2500	86	1800	82
Gelber Gasbildner	50	6	100	4	—	—
Kokken in grauen Kolonien	—	—	100	4	—	—
Gesamtzahlen	880	100	2890	100	2200	100

Resultate: Bei 37° C viel stärkere Überhandnahme der Gasbildner als bei 22° C und bei 12° C; weit vorwiegende Milchsäuregärung. Bei 22° C mehr gemischte Gärung; die Großzahl der im Impfmaterial vorhandenen Arten findet sich in der geimpften Milch wieder. Neu aufgetreten sind die Fluoreszierenden und die Kokken. Bei 12° C zeigt sich eine starke Zunahme von Bacterium fluorescens und gegenüber der Probe S M IV b eine schwache Abnahme von Bacterium Güntheri.

Serie 16.

Sterile Milch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C war.

Die Arbeitsmethode ist die übliche.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S M V a	S M V b	S M V c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	40 Stunden	3 Tage
Makroskopisches Aussehen	Blähung, kompakt gallertig geronnen	Gas, feinflockig-gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	unrein säuerlich	stark sauer	stark sauer, scharf bitter
Säuregrad	9,9 n/10 NaOH	16,8 n/10 NaOH	16,0 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Die weitaus überwiegende Flora von Milchsäurebakterien des Impfmaterials spiegelt sich getreu auch in vorstehenden Untersuchungsresultaten wieder. Bei 37° C finden wir 61 Proz. Gasbildner, denen 39 Proz. Bacterium Güntheri gegenüber stehen. — Eine auffallend starke Entwicklung zeigt schon bei 22° C und namentlich bei 12° C das Bacterium fluorescens. Diese Art hat sich bisher äußerst selten zu einer so starken absoluten wie relativen Vertretung emporzuschwingen vermocht. Alle im Gärmaterial vorhandenen Arten, mit Ausnahme von Bacillus megatherium und Bacillus mesentericus, sind in der sterilen Milch zur Entwicklung gelangt.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M V a		S M V b		S M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	400	26	900	28
Bacterium putidum	—	—	—	—	100	3
Bacterium coli	30	2	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	400	39	100	6	200	6
Bacterium aërogenes	100	10	60	4	—	—
Bacterium Güntheri	400	39	1000	64	2000	63
Gelber Gasbildner	100	10	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1030	100	1560	100	3200	100

Serie 17.

Sterile Milch, geimpft mit Sesammehl A, das angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war.

Arbeitsmethode: Die übliche.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	S M VI a	S M VI b	S M VI c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17½ Stunden	37 Stunden	4 Tage
Makroskopisches Aussehen .	starke Blähung, käsig geronnen	Gas, leicht gallertig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	unrein, sehr schwach säuerlich	schwach sauer, stark bitter	unrein sauer und scharf bitter
Säuregrad	6,6 n/10 NaOH	13,6 n/10 NaOH	15,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M VI a		S M VI b		S M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	30	2	500	14
Bacterium putidum	—	—	—	—	600	17
Bacterium coli	—	—	—	—	200	6
Bacterium acidi lactici . . .	330	46	20	1	110	3
Bacterium aërogenes	170	23	1	—	50	1
Bacterium Güntheri	200	28	1500	84	2000	58
Bacillus putrificus coli . . .	—	—	200	11	30	1
Kokken	—	—	30	2	—	—
Gelber Gasbildner	20	3	—	—	—	—
Gesamtzahlen	720	100	1781	100	3490	100

Im allgemeinen stimmen die Resultate dieser Serie mit jenen der vorherachenden überein. Von besonderer Bedeutung ist hier das verhältnismäßig gstrke Auftreten von Bacillus putrificus coli, und auch hier verdient erwähnt zu werden, daß dieser sonst säureempfindliche Sporenbildner neben einer überwiegenden Güntheriflora aufzukommen vermochte. — Mit abnehmender Temperatur ist auch in vorstehender Serie eine mannigfaltigere Spaltpilzflora zur Entwicklung gelangt.

Zusammenfassung.

1. Untersuchung des frischen und gärenden Sesammehles A.

a) Die Sesammehlprobe A erweist sich als relativ keimarm. Sie ist aber sehr artenreich. Auffallend stark sind verflüssigende Arten vertreten.

b) Im gärenden Sesammehl A nimmt die Keimzahl bei 37° C ungemein rasch zu. Auch qualitativ geht eine schnelle und gründliche Veränderung der Bakterienflora vor sich. Die Spaltpilze aus der Gruppe der Milchsäurebakterien gewinnen entschieden die Oberhand.

c) Bei 22° C verläuft die Gärung im angefeuchteten Sesammehl bedeutend langsamer; die Bakterienflora ist entschieden artenreicher.

2. Einwirkung von frischem und gärendem Sesammehl A auf Konsummilch.

a) Frisches Sesammehl: Die Einimpfung von frischem Sesammehl in einer Menge von $^1/_{100}$ g auf 100 ccm Milch vermag nach unseren Versuchen keinen wesentlichen und durchgreifenden Einfluß auf die Haltbarkeit von Konsummilch auszuüben. — In bezug auf die qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora macht sich nur in der bei 37° C aufgestellten, geimpften Milchprobe eine bedeutende Abweichung von der Kontrollprobe geltend und zwar im Sinne einer stärkeren Überhandnahme der Gasbildner auf Kosten des Bact. Güntheri.

b) Gärendes Sesammehl: Die Impfung von gewöhnlicher Konsummilch mit Sesammehl A in den verschiedenen Gärstadien in der Menge von $^1/_{100}$ g auf 100 ccm Milch übt auf die Haltbarkeit dieser Konsummilch nur dann einen nennenswerten Einfluß aus, wenn die geimpfte Probe bei 22° C aufbewahrt wird. Bei 37° C wie bei 12° C macht sich in bezug auf Haltbarkeit kein durchgreifender, makroskopisch wahrnehmbarer Unterschied gegenüber den Kontrollmilchproben geltend.

In bezug auf die qualitative Zusammensetzung der Bakterienflora läßt sich in den meisten Fällen eine schwächere oder stärkere Wirkung durch das Impfmaterial feststellen. Diese Einwirkung macht sich in erster Linie durch das Auftreten einer größeren Zahl von Arten, besonders in der bei 22° C und 12° C aufgestellten Milch geltend. Die Spaltpilzflora der geimpften Milchproben erweist sich hier durchweg viel mannigfaltiger, als jene der Kontrollmilchproben. — Da sowohl in den Kontrollmilchproben als auch im Impfmaterial die Gruppe der Milchsäurebakterien regelmäßig weitaus überwiegt, so kann nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob die in der geimpften Milch nachgewiesenen Milchsäurebakterien der natürlichen Flora der Milch selbst oder aber dem Impfmaterial entstammen.

Der Einfluß des gärenden Sesammehles A äußert sich bei 37° C regelmäßig in einer bedeutenden Vermehrung der Gasbildner auf Kosten des Bacterium Güntheri. Bei 22° C und bei 12° C dagegen kann von einer durchgreifenden Einwirkung nach dieser Richtung nicht gesprochen werden. Der Einfluß der Impfung besteht hier vielmehr darin, daß die bei

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

nichtgeimpfter Milch stets auftretende, regelmäßig ganz einseitige Milchsäuregärung durch das vermehrte Auftreten von Fluoreszierenden und Peptonisierenden mehr oder weniger gestört wird.

Von besonderer Bedeutung ist auch die Möglichkeit der Einschleppung des Bacillus putrificus coli in die Milch durch die vorgenommene Impfung.

3. Wirkung von frischem und gärendem Sesammehl auf sterile Milch.

a) Wirkung von frischem Sesammehl auf sterile Milch.

Die makroskopisch wahrnehmbare Veränderung der geimpften Milchproben ist bei 37° C eine frühere als bei 22° C und 12° C, aber eine spätere als bei den analogen mit gleichem Material geimpften Konsummilchproben.

In der als Nährmedium benutzten sterilen Milch, die mit frischem Sesammehl A geimpft wurde, findet eine scharfe Auslese aus den durch das Impfmaterial hineingebrachten Bakterienarten statt. Diese Auslese erfolgt bei höherer Temperatur (37° C) im Sinne einer Begünstigung der gasbildenden und der nichtgasbildenden Milchsäurebakterien; bei niederer Temperatur aber kommen die Fluoreszenten zu stärkerer Entwicklung.

b) Wirkung von gärendem Sesammehl auf sterile Milch.

1. Sowohl bei 37° C als auch bei 22° C tritt die makroskopische Veränderung der angesetzten Proben früher ein als bei den analogen Konsummilchproben. Bei 12° C jedoch wird gerade die entgegengesetzte Erscheinung zur Regel.

2. Der Säuregrad der geimpften Konsummilchproben ist, trotz der kürzeren Gärdauer dieser Proben, fast ausnahmslos viel größer als bei jenen Proben, die mit steriler Milch angesetzt wurden. Jedoch ist der Bakteriengehalt der letzteren ziemlich regelmäßig ein viel höherer.

3. In der sterilen Milch entwickelt sich durchgehends auch qualitativ eine artenreichere Flora als in den geimpften, analogen Kosummilchproben.

4. Bezüglich der einzelnen Arten geben die Versuche den klaren Beweis, daß sich das Bacterium Güntheri L. et N. in Konsummilch ganz bedeutend besser entwickelt, als in steriler Milch. Die Gasbildner dagegen gelangen besonders bei 37° C zu ungewöhnlich starker Vermehrung.

In steriler Milch kommt das Bacterium aërogenes aus Sesammehl, das bei 22° C in Gärung übergegangen ist, zu besonders typischer Ausbildung, während diese Art in gewöhnlicher Konsummilch, unter sonst ganz gleichen Verhältnissen, nicht aufzukommen vermag. Ebenso bildet die sterile Milch im allgemeinen auch für die Fluoreszenten ein viel günstigeres Nährmedium als gewöhnliche Konsummilch, was sich leicht aus dem verminderten Säureproduktionsvermögen des Bact. Güntheri in steriler Milch erklären läßt.

3. Sesammehlprobe B.

Die Probe stammt von der Futtermittelhandlung B. in Zürich III und wurde direkt von Marseille zugesandt. Aussehen normal; Farbe ziemlich dunkel. — Am 2. Juli 1910 Verarbeitung auf Plattenkulturen und in hohe Schichtkultur nach üblicher Methode.

Sesammehl B in frischem Zustande.

Untersuchung wie üblich. Säuregrad 6,3 n/10 NaOH.[1])

Untersuchungsresultat:

	Keimzahl pro g		
Bakterienart	absolut		in %
Bacillus mesentericus	200 000	=	21
Bacillus subtilis	160 000	=	17
Bacillus megatherium	20 000	=	2
Bacterium fluorescens	10 000	=	1
Bacillus tumescens	30 000	=	3
Weiße Streptothrichae	15 000	=	2
Bacterium herbicola aureum	5 000	=	1
Bacterium coli	10 000	=	1
Bacterium acidi lactici	20 000	=	2
Gelbe Faltenkolonie mit „Hirnstruktur“	100 000	=	10
Bewegliche Sarcina	40 000	=	4
Große Streptokokken in weißlichen Kolonien	200 000	=	21
Sproßpilz	120 000	=	13
Langstäbchen, unbekannt, schlank, nicht verfl.	10 000	=	1
Kurzstäbchen, ähnlich Bacterium acidi lactici, ohne Gasbildung	10 000	=	1
Gesamtzahl	950 000	=	100

Vorstehende Probe wurde parallel auf gewöhnliche Gelatineplatten und auf Molkengelatineplatten verarbeitet. Auf beiden Nährböden war die Zahl der entwickelten Kolonien gleich groß. — Auch die Sesammehlprobe B weist, wie aus obiger Zusammenstellung hervorgeht, eine sehr reichhaltige Bakterienflora auf, da 15 einzelne Arten isoliert werden konnten, von denen jedoch nur sechs mit den in Probe A gefundenen Spezies identisch sind. Unter diesen treten besonders die sogenannten Heu- und Kartoffelbazillen stark hervor, ferner in bescheidenerem Maße die Gruppe der Milchsäurebakterien. Auffallend ist auch der Kokkenreichtum der Probe B und das Vorkommen eines sporenlosen, unbeweglichen, dem Bacterium acidi lactici mikroskopisch nicht unähnlichen Stäbchens, das in goldgelben, mit mannigfaltigen Windungen, Höckern und Einsenkungen versehenen Kolonien wächst, deren Aussehen unwillkürlich an Hirnstruktur erinnert. Wir nannten diese, soweit uns bekannt, in der Literatur nicht beschriebene, aber wohl selbständige Art, die in der Folge im Sesam sehr häufig wiederkehrt, „gelbe Faltenkolonie“.

Untersuchung über die Veränderung der Bakterienflora im angefeuchteten Sesammehl B, in Zeiträumen von je 12 zu 12 Stunden während der Gärung.

Am 2. Juli 1910 wurden 12 Proben angesetzt, und zwar in der Weise, daß je 20 g des frischen Materials B mit 40 ccm sterilen Wassers in einem sterilisierten Erlenmeyerkölbchen tüchtig durchmischt wurden. Die Proben wurden mit sterilen Wattepfropfen verschlossen und zu 20° C verbracht. Je eine derselben wurde nun in der Folge in Terminen von je 12 zu 12 Stunden in üblicher Weise untersucht. Es wurde immer so viel vom gärenden Material abgewogen, als 2 g trockenem Mehl entsprach. Bei den ersten drei Proben, also nach 12-, 24- und 36-stündiger Gärung, verwendeten wir außer gewöhnlichen Gelatineplatten auch Molkengelatineplatten, später, als die Bakterienflora mehrheitlich Organismen aus der Gruppe der Milchsäurebakterien aufwies, wurde die Kultur auf zuckerfreien Nährböden nicht mehr berücksichtigt. Die Proben wurden benannt B 1, B 2, B 3 usw. bis B 12, je nachdem das angefeuchtete Material ½ Tag, 1 Tag, 1½ Tag usw. bis 6 Tage in Gärung war. Bei jeder Probe bestimmten wir auch den Säuregrad und zwar in der Weise, daß eine Menge des Sesammehles, welche 2 Gramm ursprünglich trockenen Materials entsprach, mit 100 ccm sterilem Wasser gut zerrieben und mit n/10 NaOH unter Benutzung von Phenolphthaleïn als Indikator bis zur schwachen Rosafärbung neutralisiert wurde.

---

[1]) Hinsichtlich Bestimmung des Säuregrades siehe folgende Seite.

Voruntersuchung:

Zusammenstellung.

Kurze Bezeichnung	Dauer der Gärung Std.	Verwendete Gewichtsmenge g	Makroskopisches Aussehen der gärenden Probe	Säuregrad in n/10 NaOH
B	0	2,0000	Frische Probe B, normal, etwas dunkel	6,3
B 1	12	5,9483	Noch wenig verändert, Geruch nach feuchtem Mehle	6,8
B 2	24	5,9443	Farbe noch unverändert, Geruch ganz schwach säuerlich	9,7
B 3	36	5,9299	Farbe schwach gelblich, deutlich säuerlicher Geruch	14,6
B 4	48	5,8985	Schwacher Schimmelanflug, säuerlicher bis schwach muffiger Geruch	15,6
B 5	60	5,8817	Schimmelanflug, Geruch säuerlich-muffig	10,1
B 6	72	5,8725	Probe stark vergilbt, oberste Zone schwach bräunlich, fauliger Geruch, ganz schwache NH_3-Dämpfe	8,8
B 7	84	5,8612	Schmutzig-gelblich verfärbt, bedeutende Schimmelbildung, Geruch faulig, nach Ammoniak, deutliche NH_3-Dämpfe	8,9
B 8	96	5,8480	Schimmelwucherung zunehmend, Geruch faulig-muffig, stinkend — starke NH_3-Dämpfe	6,5
B 9	108	5,8325	Gelbe Färbung etwas verblichen, oberste Schicht durch Schimmelmycelien kompakt verklebt	5,9
B 10	120	5,8110	Kompakter, dicker, oberflächlicher Belag, reiche Schimmelwucherung, penetranter Geruch, starke Ammoniakentwicklung	4,8
B 11	132	5,8003	Wie B 10	5,1
B 12	144	5,7863	Dichter Schimmelrasen, ganze Masse in fauliger Zersetzung	4,6

In bezug auf die allgemeinen Veränderungserscheinungen bei den gärenden Sesammehlproben ist in den ersten Gärstadien eine ganz bedeutende und rasche Zunahme des Säuregrades festzustellen. Nach 48 Stunden war jedoch der diesbezügliche Höhepunkt schon erreicht. Er betrug 15,6 ccm n/10 NaOH pro 2 g aufgeschwemmtes Material. Von da an findet eine nahezu ständige Abnahme des Säuregehaltes statt, was ohne Zweifel der Überhandnahme von Schimmelpilzen zuzuschreiben ist. Das Sesammehl geht in der Folge immer mehr einer tiefgreifenden Eiweißzersetzung entgegen, worauf der durchdringende, faulige Geruch und die leicht nachweisbaren, aufsteigenden Ammoniakdämpfe deutlich genug hinweisen.

Bakteriologischer Befund siehe folgende Seite.

Aus der Zusammenstellung ist zu entnehmen, daß die Keimzahl im angefeuchteten Sesammehl bei Zimmertemperatur während den ersten 24 Stunden nur allmählich zunimmt. Bis nach 12 Stunden war sie erst um das

5,5-fache gestiegen. Nach 24 Stunden jedoch wurde schon ein bedeutend schnelleres Vermehrungstempo eingeschlagen; denn wir finden nun eine ca. 122-fache Zahl der ursprünglichen Keime. Von da an geht die Vermehrung äußerst rasch vorwärts, hat aber trotzdem erst zwischen dem vierten und fünften Tage die maximale Höhe erreicht und nun geht es langsam zurück. Zwischen dem vierten und fünften Tage erscheint der Gehalt an Spaltpilzen bald abnehmend, bald zunehmend, also innerhalb gewisser Grenzen schwankend.

Bakteriologischer Befund.
Von der Gesamtbakterienzahl sind beteiligt in %.

Probe	Bakterienzahl in Mill. pro g trockenes Sesammehl berechnet	Bac. mesentericus u. Bac. subtilis	Bacterium fluorescens	Bacterium putidum	Bacterium coli	Bacterium acidi lactici	Bacterium aërogenes	Bacterium Güntheri	Gelber Gasbildner	Gelber Säurebildner	Gelbe Faltenkolonie	Bacillus putrificus coli	Rest
B 1	5,26	48	2	—	—	2	—	—	17	6	—	—	25
B 2	116	4	11	3	1	2	2	—	7	68	+1)	—	2
B 3	2 213	+1)	1	1	—	10	4	—	1	72	11	—	—
B 4	25 235	+1)	1	1	7	9	1	+1)	33	31	17	—	—
B 5	51 083	—	4	1	6	17	11	+1)	47	12	2	+1)	—
B 6	64 404	—	7	+1)	9	5	4	7	62	6	—	+1)	—
B 7	51 970	—	10	1	13	8	6	7	53	2	—	+1)	—
B 8	75 200	—	3	1	26	14	8	4	43	1	—	—	—
B 9	75 900	—	23	4	8	14	11	+1)	39	1	—	—	—
B 10	63 900	—	19	7	9	12	3	2	48	+1)	—	—	—
B 11	75 000	—	9	5	5	16	6	1	58	—	—	—	—
B 12	57 180	—	22	11	1	8	3	2	53	—	—	—	—

Was die qualitative Zusammensetzung der Flora betrifft, so ist hier der sonst beobachtete, im Verlauf der Gärung in der Regel vollständige Wechsel der Arten bei weitem nicht so ausgeprägt, wie in den früheren Proben. Von den im frischen Material vorhandenen 15 Arten verblieben bis zum Schlusse zwar nur mehr 3, aber schon nach 48-stündiger Gärung waren alle am sechsten Tage noch nachgewiesenen Arten vorhanden. Die Stammflora der Gas- und Säurebildner hat sich bis zum Schlusse mit vollem Erfolg zu behaupten vermocht und der sonst beobachtete metabiotische Vorgang der Gärung ist hier also nicht ein ausgesprochener.

Vor allem fällt in den Versuchen mit Probe B auf, daß ausnahmsweise einmal das Bacterium Güntheri nicht die Oberhand zu gewinnen vermochte. Die gelben Kurzstäbchen (Gasbildner Holliger und Säurebildner Levy) hatten schon von Anfang an ein entscheidendes Übergewicht erlangt und behielten dieses auch bis zum Schlusse beständig bei. Nebenbei spielten auch die gasbildenden Milchsäurebakterien während des ganzen 6-tägigen Gärungsverlaufes eine wichtige Rolle, was wohl zum großen Teile auch dem Umstande zuzuschreiben ist, daß die überhandnehmende Schimmelbildung beständig die für die Gas- und Säurebildner besonders entwicklungshemmenden Stoffwechselprodukte, die Säuren, immer wieder beseitigten oder doch dezimierten. Vom zweiten Tage an, wo die Schimmelbildung in bedeutendem Maße einzusetzen begonnen hatte, finden wir daher, trotz der noch

---

1) **Vorhanden, aber unter ½ Proz. der Gesamt-Mikroflora.**

immer sehr beträchtlichen Zunahme der säurebildenden Arten, einen beständigen Rückgang des Säuregrades.

Die Eiweißstoffzersetzung und die damit verbundene starke Ammoniakentwicklung wurde außer durch Schimmelpilze auch durch die Fluoreszierenden gefördert; diese Gruppe war schon vom zweiten Tage an zu einer gewissen Bedeutung gelangt und trat gegen den Schluß der Gärung stärker in den Vordergrund.

Zu erwähnen ist schließlich der schnelle und vollständige Rückgang der Heu- und Kartoffelbazillen. Diese bekannte Gruppe, im frischen Material mit 38 Proz., im 12 Stunden alten sogar mit 44 Proz. vertreten, ist bis zum Schlusse des zweiten Tages vollständig verschwunden. Ohne Zweifel hat die starke Zunahme des Säuregrades diese Erscheinung herbeigeführt.

4. Sesammehlprobe C.

Vergleichende Versuche der Einwirkung verschiedener Wasserzusätze auf die Bakterienflora des gärenden Futtermittels.

Die Sesamprobe stammt von der Domäne Longeville bei Yverdon und wurde vom dortigen Verwalter, Herrn J. B., eingesandt. Aussehen des Untersuchungsmaterials normal, frisch. Von dieser Probe wurden 32 Portionen von je 20 g steril abgewogen und dann mit verschiedenen Quantitäten sterilen Wassers gut durchmischt. 16 der so hergestellten Proben kamen zu 20° C, die anderen 16 aber zu 30° C und nach 24 Stunden bzw. 4 Tagen wurden die Proben quantitativ und qualitativ untersucht.

Übersicht der Verarbeitung.

a) Mit 25% Wasserzusatz (zu 20 g Material wurden 5 g Wasser zugesetzt):

Probe	Gärung	Probe	Gärung
C 1	= 1 Tag bei 20° C	C 3	= 4 Tage bei 20° C
C 2	= 1 Tag bei 30° C	C 4	= 4 Tage bei 30° C
b) Mit 50% Wasserzusatz:			
C 5	= 1 Tag bei 20° C	C 7	= 4 Tage bei 20° C
C 6	= 1 Tag bei 30° C	C 8	= 4 Tage bei 30° C
c) Mit 75% Wasserzusatz:			
C 9	= 1 Tag bei 20° C	C 11	= 4 Tage bei 20° C
C 10	= 1 Tag bei 30° C	C 12	= 4 Tage bei 30° C
d) Mit 100% Wasserzusatz:			
C 13	= 1 Tag bei 20° C	C 15	= 4 Tage bei 20° C
C 14	= 1 Tag bei 30° C	C 16	= 4 Tage bei 30° C
e) Mit 125% Wasserzusatz:			
C 17	= 1 Tag bei 20° C	C 19	= 4 Tage bei 20° C
C 18	= 1 Tag bei 30° C	C 20	= 4 Tage bei 30° C
f) Mit 150% Wasserzusatz:			
C 21	= 1 Tag bei 20° C	C 23	= 4 Tage bei 20° C
C 22	= 1 Tag bei 30° C	C 24	= 4 Tage bei 30° C
g) Mit 175% Wasserzusatz:			
C 25	= 1 Tag bei 20° C	C 27	= 4 Tage bei 20° C
C 26	= 1 Tag bei 30° C	C 28	= 4 Tage bei 30° C
h) Mit 200% Wasserzusatz:			
C 29	= 1 Tag bei 20° C	C 31	= 4 Tage bei 20° C
C 30	= 1 Tag bei 30° C	C 32	= 4 Tage bei 30° C

Sesammehl C frisch.

12. Juli 1910. Verarbeitung wie gewöhnlich, aber auf zwei verschiedene Gelatine- und zwei verschiedene Agarnährböden als Plattenkulturen.

19. Juli: Die auf den Platten entwickelte Bakterienflora erscheint schon makroskopisch sehr einheitlich, fast alles sind kompakte, brockenförmige, knorpelige, blaßgelbliche bis deutlich zitronengelbe Kolonien, die sich sehr leicht als ganzes Korn vom Nährboden abheben lassen. Die Gelatine wird von dieser Art nicht verflüssigt; die Tiefenkolonien sind, wie die Oberflächenkolonien, stets zackig, etwas weicher als die Oberflächenkolonien, in typischer Ausbildung von konglomeratähnlicher Beschaffenheit. Die in der Literatur, soweit uns bekannt, nicht beschriebenen Organismen erweisen sich als unbewegliche, sporenlose Kurzstäbchen von 1—1,5 × 0,8 μ. Wir nennen sie im folgenden kurz „Brockenkolonie“, ihrer Struktur entsprechend. Säuregrad der Sesammehlprobe C frisch 6,0 ccm n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund:

Bakterienflora von Sesammehl C frisch

	Keimzahl pro g		
Gelbliche Brockenkolonie	260 000	=	85 %
Bacillus mesentericus	1 900	=	1 %
Bacterium acidi lactici	400	=	— %
Diplococcus, langsam verflüssigend	40 000	=	13 %
Gelber Gasbildner	300	=	— %
Streptothrix-Spezies, weiß	600	=	— %
Schlankes Kurzstäbchen in ziegelroten Kolonien	3 000	=	1 %
Gesamtzahl	306 200	=	100 %

Die Spaltpilzflora des Sesammehles C ist also beherrscht durch die Brockenkolonien. Auf den Agarplatten erscheint die Art, die wir nicht weiter verfolgten, nicht selten in rosettenförmigen Gebilden. Sie ist ausgesprochen sauerstoffliebend und gedeiht besser bei einer Temperatur von 30—37° C, als auf Gelatineplatten bei 20° C.

Sesammehl C angefeuchtet.

a) Sesammehl C mit 25 Proz. Wasserzusatz.

Wir fassen im folgenden in möglichst gedrängter Darstellung immer je vier Proben mit gleichem Wasserzusatz zusammen.

Makroskopisches Aussehen der Proben:

C 1 = 1 Tag bei 20° C: Noch ganz unverändert, Säuregrad 6,4 n/10 NaOH.
C 2 = 1 Tag bei 30° C: Kaum merklich verändert, Probe trocken-krümelig; Säuregrad 6,2 n/10 NaOH.
C 3 = 4 Tage bei 20° C: Spärlicher Schimmelanflug, muffiger Geruch, kein Ammoniak; Säuregrad 5,4 n/10 NaOH.
C 4 = 4 Tage bei 30° C: Stark verschimmelt, Masse ziemlich fest zusammenklebend, kein Ammoniak wahrnehmbar; Säuregrad 4,0 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Bei 30° C entwickelte sich im Sesammehl C, das mit 25 Proz. sterilen Wassers versetzt wurde, sowohl quantitativ als auch qualitativ eine reichere Pilzflora, als unter sonst gleichen Bedingungen bei 20° C. Sowohl die Temperatur als auch die Gärdauer ist daher von großem Einfluß auf die Zusammensetzung des Bakterienbestandes. Auffallend gut entwickelte sich bei diesem bescheidenen Wasserzusatz von 25 Proz. der Gewichtsmenge des Untersuchungsmaterials der Bacillus mesentericus.

Mikroskopischer Befund
(Zahlen in Millionen pro g trockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 1		Probe C 2		Probe C 3		Probe C 4	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	0,300	69	0,500	16	20,0	32	700	62
Bacillus tumescens	0,009	2	—	—	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . .	—	—	0,090	3	0,3	1	50	4
Bacterium aërogenes . . .	0,005	1	0,300	10	0,5	1	150	13
Gelber Gasbildner	—	—	—	—	—	—	12	1
Brockenkolonie	0,020	5	0,900	30	8,0	12	80	7
Streptothrix, weiß	0,020	5	0,200	7	—	—	—	—
Diplokokken, nicht verfl. .	0,070	16	0,250	8	13,0	21	110	10
Diplokokken, ziegelrote Kol.	—	—	0,200	7	—	—	—	—
Coccus, gelblich, langs. verfl.	—	—	0,500	16	—	—	—	—
Kurzstäbchen, rosarote Kol.	0,010	2	0,090	3	—	—	—	—
Sproßpilz	—	—	—	—	21,0	33	30	3
Gesamtzahlen	0,434	100	3,030	100	62,8	100	1132	100

b) Sesammehl C mit 50 Proz. Wasserzusatz.

Makroskopisches Aussehen der verarbeiteten Proben:

Probe C5: **1 Tag bei 20° C, noch normales Aussehen; Masse aber beim Umrühren sich sehr stark zusammenballend; Säuregrad 6,6 n/10 NaOH.**

Probe C6: **1 Tag bei 30° C, Farbe kaum verändert; beim Umrühren aber wie Kleister am Glasstab klebend; Säuregrad 7,4 n/10 NaOH.**

Probe C7: **4 Tage bei 20° C, Material zu festen Klumpen verhärtet, beim Umrühren leicht krümelig zerfallend, etwas schimmelig, Geruch muffig, ganz schwache Ammoniakdämpfe nachweisbar; Säuregrad 3,8 n/10 NaOH.**

Probe C8: **4 Tage bei 30° C, schwacher Schimmelanflug, Geruch muffig, Masse bräunlich verfärbt, beim Durchmischen stark verkleisternd, deutliche NH_3-Dämpfe; Säuregrad 2,9 n/10 NaOH.**

Mikroskopischer Befund
(Keimzahlen in Millionen pro g trockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 5		Probe C 6		Probe C 7		Probe C 8	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	0,730	22	8	—	5	—	1300	65
Bacillus tumescens	0,060	2	—	—	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . .	—	—	30	2	90	7	60	3
Bacterium aërogenes . . .	0,030	1	100	5	600	46	460	23
Bacterium Güntheri . . .	—	—	—	—	—	—	150	7
Gelber Gasbildner	—	—	—	—	90	7	—	—
Brockenkolonien	1,030	31	1710	91	—	—	39	2
Faltenkolonien	—	—	—	—	3	—	—	—
Weiße Streptothrix	—	—	—	—	—	—	3	—
Kokken, grau, nicht verfl.	—	—	30	2	500	38	—	—
Kokken, ziegelrote Kolonien	0,080	2	—	—	—	—	—	—
Sproßpilze	1,400	42	—	—	25	2	—	—
Gesamtzahlen	3,330	100	1878	100	1313	100	2012	100

Ergebnisse: Proben 1 Tag alt: Bei 30° C trat eine ca. 564 mal raschere Vermehrung ein als bei 20° C. Von den acht vorkommenden Arten sind nur drei beiden Proben gemeinsam und diese drei haben sich alle bei 30° C viel stärker vermehrt als bei 20° C. Etwas befremden könnte es allenfalls, daß Bacillus mesentericus bei 20° C 22 Proz. der gesamten Bakterienzahl ausmacht, bei 30° C aber nicht einmal ½ Proz. erreicht, während ja bekanntlich dieser Spaltpilz bei 30° C viel üppiger wächst als bei 20° C. Wir dürfen aber zur richtigen Beurteilung der Verhältnisse hier nicht von den Relativzahlen ausgehen, sondern müssen die absoluten Zahlen in Betracht ziehen und da ist das Wachstumsverhältnis von Bacillus mesentericus bei 20 und 30° C wie 1 : 11. Also hat sich dieser Spaltpilz bei 30° bedeutend rascher vermehrt.

Für den Sproßpilz und die „Brockenkolonie“ war die Temperatur von 20° C sehr günstig. Ein geradezu riesenhaftes Wachstum aber zeigt letztere bei 30° C. — Probe C 7 ist charakterisiert durch das ausgesprochene Übergewicht der gasbildenden Milchsäurebakterien und durch die reichliche Kokkenflora, während Probe 8 eine ungewöhnlich üppige Entwicklung von Bacillus mesentericus aufweist.

c) Sesammehl C mit 75 Proz. Wasserzusatz.

Voruntersuchung:

Probe C 9: 1 Tag bei 20° C. Die Masse des Untersuchungsmaterials ist in kleinen Brocken locker gelagert; beim Umrühren kleisterartig, Geruch nicht unangenehm, an frisches Brot erinnernd; Säuregrad 7,5 n/10 NaOH.

Probe C 10: 1 Tag bei 30° C, im allgemeinen wie C 9, nur noch mehr kleisterartig und mit deutlich säuerlichem Geruch; Säuregrad 7,1 n/10 NaOH

Probe C 11: 4 Tage bei 20° C, bedeutende Schimmelbildung, Masse durch die Mycelien an der Oberfläche zu dichter Decke zusammengeklebt, beim Umrühren klebrig, Geruch schimmelig, deutliche Ammoniakdämpfe; Säuregrad 5,6 n/10 NaOH.

Probe C 12: 4 Tage bei 30° C, Aussehen ähnlich wie bei Probe C 11; Probe nur mehr bräunlich verfärbt, stärker zersetzt; Säuregrad 2,3 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 9		Probe C 10		Probe C 11		Probe C 12	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	300	5	2700	22	2300	58
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	3	—	75	2
Bacterium putidum	—	—	—	—	—	—	150	4
Bacillus tumescens	—	—	150	2	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . .	0,20	1	400	6	1500	13	300	7
Bacterium aërogenes . . .	0,30	2	1100	17	2500	21	1100	27
Gelber Gasbildner.	—	—	—	—	400	3	—	—
Brockenkolonie	12,20	87	4300	67	5000	41	20	1
Kokken, langsam verflüss. .	1,30	10	200	3	—	—	—	—
Bacterium Güntheri . . .	—	—	—	—	—	—	20	1
Gesamtzahlen	14,00	100	6450	100	12103	100	3965	100

Ergebnisse: Bei 30° C ist nach 1 Tage eine schnellere Entwicklung festzustellen als bei 20° C, zudem ist die Flora artenreicher. Die Brockenkolonien sind beiderorts weit überwiegend. — Nach 4 Tagen findet sich bei 20° C eine viel größere Gesamtkeimzahl als bei 30° C, unter sonst gleichen Verhältnissen. Die Brockenkolonien sind immer noch vorherrschend. Doch ist die Artenzahl gestiegen. Bei beiden Temperaturen spielen der Bacillus mesentericus und die gasbildenden Milchsäurebakterien die Hauptrolle. In allen vier Proben hat der höhere Wassergehalt die Entwicklung der Spaltpilzflora sichtlich in förderndem Sinne beeinflußt.

d) Sesammehl C mit 100 Proz. Wasserzusatz.

Makroskopische Untersuchung:

Probe C 13: 24 Stunden bei 20° C; äußerlich noch unverändert, Geruch erinnert an jenen von grünen Erbsenkonserven, die Masse ist beim Umrühren stark kleberig. Säuregrad 6,4 n/10 NaOH.

Probe C 14: 24 Stunden bei 30° C; makroskopisches Aussehen ähnlich wie bei C 13, nur Geruch deutlich säuerlich, ganz schwach beginnender Schimmelanflug, Säuregrad 7,6 n/10 NaOH.

Probe C 15: 4 Tage bei 20° C; hier ist besonders starke Schimmelentwicklung eingetreten; die ganze Masse ist schmutzig-gelblich verfärbt, kompakt zusammenklebend, beim Umrühren zäh kleisterartig, Geruch stinkend muffig, deutliche Ammoniakdämpfe entwickelnd, Säuregrad 5,1 n/10 NaOH.

Probe C 16: 4 Tage bei 30° C; üppige Schimmelbildung, Masse intensiv schmutzig-gelblich verfärbt, stark verkleisternd, Geruch stinkend-muffig, sehr starke Ammoniakdämpfe; Säuregrad 3,6 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund
(Zahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 13		Probe C 14		Probe C 15		Probe C 16	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	8	—	—	—	22 000	28
Bacterium fluorescens . . .	0,40	2	4	—	9	—	900	2
Bacterium putidum	1,00	5	80	4	1 500	4	3 000	4
Bacterium acidi lactici . .	0,40	2	200	9	2 000	6	5 000	7
Bacterium aërogenes . . .	0,60	3	400	18	9 000	27	34 000	47
Bacterium Güntheri . . .	0,60	3	80	4	1 000	3	2 000	3
Gelber Gasbildner.	—	—	—	—	9 000	27	6 000	9
Brockenkolonien	13,10	67	600	27	11 000	33	300	—
Kokken	3,50	18	250	11	—	—	—	—
Sproßpilze	—	—	600	27	—	—	—	—
Gesamtzahlen	19,6	100	2222	100	33 509	100	73 200	100

Resultate: Quantitativ wie qualitativ reichere Pilzflora bei 30° C als bei 20° C, riesige Vermehrung bei beiden Temperaturen im Verlaufe von 4 Tagen; überall starkes Hervortreten der Gasbildner. Bacillus mesentericus behauptet sich nur bei 30° C, die Kokken verschwinden bei längerer Gärdauer.

e) Sesammehl C mit 125 Proz. Wasserzusatz.

Makroskopische Vorprüfung der gärenden Proben:

Probe C 17: 1 Tag bei 20° C; Material makroskopisch noch unverändert, beim Umrühren stark verkleisternd, Säuregrad 6,8 n/10 NaOH.

Probe C 18: 1 Tag bei 30° C; ähnlich wie Probe 17, nur schwach säuerlicher Geruch, Säuregrad 8,0 n/10 NaOH.

Probe C 19: 4 Tage bei 20° C; bedeutende Schimmelbildung, ganze Masse schmutzig-gelb verfärbt, beim Umrühren zäh kleberig, Geruch stinkend-muffig-faulig, Säuregrad 7,0 n/10 NaOH.

Probe C 20: 4 Tage bei 30° C, ähnlich wie Probe C 19, Masse sehr stark in Zersetzung übergegangen, Geruch muffig, stark stinkend, Säuregrad 4,6 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund
(Zahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 17		Probe C 18		Probe C 19		Probe C 20	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	1	—	3 000	5	6 000	35
Bacterium fluorescens . . .	1	1	—	—	6 000	9	200	1
Bacterium putidum	—	—	—	—	2 000	3	2 300	14
Bacterium coli	—	—	140	2	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . .	1	1	110	2	17 000	25	2 000	12
Bacterium aërogenes . . .	2	2	680	10	7 000	10	5 000	29
Bacterium Güntheri . . .	2	2	3300	48	3 000	5	400	3
Gelber Gasbildner.	—	—	—	—	12 000	17	500	3
Kokken	110	84	2000	30	2 600	4	400	3
Unbew. Buttersäurebacillus	—	—	—	—	—	—	10	—
Brockenkolonie	13	10	550	8	15 000	22	—	—
Gesamtzahlen	129	100	6781	100	67 600	100	16 810	100

Ergebnisse: Bei einem Wasserzusatz von 125 Proz. ist im Sesammehl das Maximum der Kokkenentwicklung festzustellen; nach 24 Stunden bei 20° C nehmen diese Organismen den größten Prozentsatz, den sie je einmal erreichten, bei 30° C nach 24 Stunden die größte absolute Zahl, ein. Bei 30° C hat nach 24 Stunden das Bacterium Güntheri die Oberhand; in der Folge wird jedoch die Gasbildnerflora tonangebend. Nach 4 Tagen nimmt diese den ersten Rang ein. Daneben hat bei 30° C der Bacillus mesentericus eine führende Rolle inne.

f) Sesammehl C mit 150 Proz. Wasserzusatz.

Probe C 21: 1 Tag bei 20° C; makroskopisches Aussehen wie Probe C 17, Säuregrad 7,1 n/10 NaOH.

Probe C 22: 1 Tag bei 30° C; ganz schwach gelblich verfärbt, Spuren von Schimmelanflug, Geruch neigt zu säuerlich-muffigsein, Säuregrad 9,2 n/10 NaOH.

Probe C 23: 4 Tage bei 20° C; mäßige Schimmelbildung, ganze Masse schmutziggelb verfärbt, beim Umrühren nur schwach kleisterartig, Geruch muffig-säuerlich, deutliche Ammoniakdämpfe; Säuregrad 10,2 n/10 NaOH.

Probe C 24: 4 Tage bei 30° C; makroskopisches Aussehen ähnlich wie bei Probe 23, nur stärkere Schimmelbildung und Geruch noch mehr stinkend-faulig, deutliche Ammoniakdämpfe, Säuregrad 6,2 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse: Auch hier ist bei 30° C nach 24 Stunden eine nach Zahl und Art erheblich reichere Flora zur Entwicklung gelangt, als bei 20° C Gärtemperatur. Das in sogenannten „Brockenkolonien" wachsende, unbekannte Stäbchen, welches nach 24-stündiger Gärung sowohl bei 20 als bei 30° C die am zahlreichsten vertretene Art darstellt, ist bei 20° C nach 4 Tagen noch knapp, bei 30° C gar nicht mehr nachweisbar. Erwähnenswert ist, daß diese Art, die ein Charakteristikum von Sesam darzustellen scheint, in zwei Varianten auftritt, nämlich als deutlich goldgelblich gefärbte Rasse und in blassen, weißlichgrauen Kolonien. Letztere dürften durch Mutation aus ersteren entstanden sein.

Die Fluoreszenten scheinen bei einem Wasserzusatz von 150 Proz. das Maximum ihrer Entwicklung zu erreichen. Das Bacterium Güntheri entwickelte sich nur in mäßiger Weise.

Mikroskopischer Befund.
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 21		Probe C 22		Probe C 23		Probe C 24	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	5	—	50	—	900	7
Bacterium fluorescens . . .	0,1	—	—	—	500	1	500	4
Bacterium putidum	—	—	30	1	19 000	36	3 000	23
Bacterium coli	—	—	30	1	2 500	5	—	—
Bacterium acidi lactici . .	0,1	—	70	3	7 000	14	1 000	8
Bacterium aërogenes . . .	0,8	3	530	23	14 000	27	3 000	23
Bacterium Güntheri . . .	—	—	10	—	6 000	11	4 000	30
Gelber Gasbildner.	2,0	7	310	14	3 000	6	700	5
Brockenkolonien	21,0	78	1100	49	20	—	—	—
Gelbe Faltenkolonie . . .	2,0	7	—	—	—	—	—	—
Kokken	1,3	5	200	9	—	—	—	—
Unbew. Buttersäurebacillus	—	—	—	—	8	—	3	—
Gesamtzahlen	27,3	100	2285	100	52 078	100	13 103	100

g) Sesammehl C mit 175 Proz. Wasserzusatz.

Probe C 25: 1 Tag bei 22° C; Aussehen noch normal, nur ganz schwach gelblich verfärbt, Geruch nach grünen Erbsen, nicht merklich sauer; Masse infolge größeren Wasserzusatzes nur wenig klebrig, Säuregrad 6,7 n/10 NaOH.

Probe C 26: 1 Tag bei 30° C; ähnlich wie Probe 25, nur etwas deutlicher verfärbt, Geruch schwach säuerlich. Säuregrad 8,2 n/10 NaOH.

Probe C 27: 4 Tage bei 20° C; ganz schwacher Schimmelanflug, Masse stark schmutzig-gelblich verfärbt, Oberfläche mit Bacillus mesentericus überwuchert, Geruch säuerlich und schwach faulig-muffig, Säuregrad 11,2 n/10 NaOH.

Probe C 28: 4 Tage bei 30° C; ähnlich wie C 27, aber Zersetzung weiter fortgeschritten, Geruch intensiv stinkend, wenig säuerlich, schwache Ammoniakdämpfe, Säuregrad 8,1 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 25		Probe C 26		Probe C 27		Probe C 28	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	—	—	2 000	5	400	3
Bacterium fluorescens . . .	0,5	1	40	—	5 000	13	500	4
Bacterium putidum	—	—	1 000	8	4 000	10	—	—
Bacterium coli	—	—	110	1	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . .	—	—	300	2	1 500	4	200	2
Bacterium aërogenes . . .	0,7	1	4 700	35	11 000	28	900	7
Bacterium Güntheri . . .	7,0	12	2 000	15	7 000	17	10 000	80
Gelber Gasbildner.	—	—	1 800	13	9 000	23	500	4
Brockenkolonien	43,0	77	1 100	8	—	—	—	—
Kokken	4,0	7	2 400	18	—	—	—	—
Weiße Streptothrix	1,0	2	—	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	56,2	100	13 450	100	39 500	100	12 500	100

Die „Brockenkolonien“ zeigen nach 1 Tage bei 20° C die beste Entwicklung; sie nehmen 77 Proz. der gesamten Keimzahl ein. Bei 30° C bilden die Gasbildner nach einem Tage das Übergewicht. Das Bacterium Güntheri erreicht bei 30° C nach 4 Tagen bei einem Wasserzusatz von 175 Proz. seine maximale Entwicklung (80 Proz.), zeigt aber ein etwas reduziertes

Säureproduktionsvermögen. Deshalb läßt sich der relativ niedrige Säuregrad, der zum Teil auch dem Auftreten von säureverzehrenden Schimmelpilzen zuzuschreiben ist, erklären.

h) Sesammehl C mit 200 Proz. Wasserzusatz.

Probe C 29: 1 Tag bei 20° C; makroskopisch kaum verändert, Aussehen wie bei C 25, Säuregrad 6,5 n/10 NaOH.

Probe C 30: 1 Tag bei 30° C; Beginn einer schmutzig-gelblichen Verfärbung, Geruch deutlich muffig-stinkend; es werden schwache NH_3-Dämpfe entwickelt, Säuregrad 8,5 n/10 NaOH.

Probe C 31: 4 Tage bei 20° C, starke Verfärbung, Geruch stinkend-muffig, aber deutlich säuerlich, Säuregrad 13,2 n/10 NaOH.

Probe C 32: 4 Tage bei 30° C; ungefähr wie Probe C 31; nur mehr zersetzt; schwache Wucherung von Bacillus mesentericus, Säuregrad 8,5 n/10 NaOH.

Mikroskopischer Befund.
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet).

Bakterienart	Probe C 29		Probe C 30		Probe C 31		Probe C 32	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	—	—	3 500	18	1 000	5
Bacterium fluorescens . . .	0,7	1	—	—	1 600	8	2 000	11
Bacterium putidum	—	—	300	5	6 700	35	2 000	11
Bacterium acidi lactici . .	—	—	300	5	800	4	5 000	26
Bacterium aërogenes . . .	1,5	2	3500	51	1 100	5	4 000	21
Bacterium Güntheri . . .	—	—	700	10	1 000	5	5 000	26
Gelber Gasbildner.	—	—	700	10	800	4	—	—
Gelber Säurebildner . . .	—	—	400	6	3 500	18	—	—
Brockenkolonien	82,0	96	900	13	700	3	—	—
Weiße Streptothrix	1,2	1	—	—	—	—	—	—
Gesamtzahlen	85,4	100	6800	100	19 700	100	19 000	100

Ergebnis: Artenarmut bei 20° C nach 1 Tage; Auftreten der weißen Streptothrix; bei 30° C sehr starkes Auftreten der Milchsäurebakterien.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Zusammenstellung der Untersuchungsergebnisse siehe folgende Seite.

1. Die Menge des Wasserzusatzes zu Sesammehl C, sowie das Aufstellen des angefeuchteten Mehles bei verschiedenen Gärtemperaturen, hat eine sehr große Einwirkung auf die quantitative und qualitative Zusammensetzung der Spaltpilzflora des Gärmaterials.

2. Der Säuregrad des Gärmaterials ist bei verschiedenen Wasserzusätzen sowohl bei 20 als bei 30° C nach 24 Stunden ein ziemlich unregelmäßiger, aber ein innerhalb verhältnismäßig kleinen Werten schwankender. Das 4 Tage alte Gärmaterial hingegen zeigt bei 20° C wie bei 30° C eine bestimmte, durch die verschiedenen Wasserzusätze bedingte Regelmäßigkeit, besonders im Verlaufe der Säuregradskurven, indem mit steigendem Wasserzusatz bei 50 resp. 75 Proz. in unseren Versuchen ein Minimum des Säuregrades erreicht wird, von dem aus dann bis zu einem Wassergehalt von 200 Proz. ein beständiges Ansteigen des Säuregehaltes beobachtet werden kann. Diese Erscheinung ist zum großen Teil der mit steigender Wassergabe zurücktretenden Schimmelbildung zuzuschreiben.

3. Der für eine optimale Bakterienentwicklung im Sesammehl C geforderte Wasserzusatz liegt nach vorstehenden Versuchen im allgemeinen zwischen 100—125 Proz. des zur Gärung verwendeten frischen Materials.

4. Bei 30° C ist das Bakterienwachstum im Sesammehl C unter sonst gleichen Bedingungen viel energischer und rascher als bei 20° C. Im ersteren Falle entwickelt sich auch ganz regelmäßig eine viel artenreichere Pilzflora.

5. Im Sesammehl C zeigte sich die maximale Schimmelentwicklung bei einem Wasserzusatz von 50—100 Proz.; nach aufwärts und abwärts macht sich ein allmählicher Rückgang in der Entwicklungsintensität geltend.

6. Bacillus mesentericus hat nach 4 Tagen seine optimale Entwicklung bei 30° C. Er zeigt ganz deutlich die Tendenz, mit zunehmendem Wasserzusatz immer mehr zurückzugehen.

Zusammenstellung.

Kurze Bezeichnung der Probe	Gärdauer u. Gärtemperatur	Wasserzusatz in %	Säuregrad	Gesamtkeimzahl pro g trockenen Materials in Millionen	Prozentuelle Vertretung der wichtigsten Arten						
					B. mesentericus	Fluoreszierende	Gasbildende Milchsäureb.	Bacterium Güntheri	Brockenkolonien	Kokken	Verschiedenes
C frisch	—	—	6,0	0,3062	1	—	+[1])	—	85	13	1
C 1	1 Tag bei 20° C	25	6,4	0,434	69	—	1	—	5	16	9
C 5		50	6,6	3,330	22	—	1	—	31	2	44
C 9		75	7,5	14,0	+[1])	+[1])	3	—	87	10	—
C 13		100	6,4	19,6	+	7	5	3	67	18	—
C 17		125	6,8	129,0	+	1	3	2	10	84	—
C 21		150	7,1	27,3	+	+	3	—	78	5	14
C 25		175	6,7	56,2	—	1	1	12	77	7	2
C 29		200	6,5	85,4	—	1	2	—	96	—	1
C 2	1 Tag bei 30° C	25	6,2	3,03	16	—	13	—	30	31	10
C 6		50	7,4	1 878	+	—	7	—	91	2	—
C 10		75	7,1	6 450	5	—	23	—	67	3	2
C 14		100	7,6	2 222	+	4	27	4	27	11	27
C 18		125	8,0	6 781	+	+	14	48	8	30	—
C 22		150	9,2	2 285	+	1	27	+	49	9	14
C 26		175	8,2	13 450	—	8	38	15	8	18	13
C 30		200	8,5	6 800	—	5	56	10	13	—	16
C 3	4 Tage bei 20° C	25	5,4	62,8	32	—	2	—	12	21	33
C 7		50	3,8	1 313	+	—	53	—	—	38	9
C 11		75	5,6	12 103	22	+	34	+	41	—	3
C 15		100	5,1	33 509	+	4	33	3	33	—	27
C 19		125	7,0	67 600	5	12	35	5	22	4	17
C 23		150	10,2	52 078	+	37	46	11	+	—	6
C 27		175	11,2	39 500	5	23	32	17	—	—	23
C 31		200	13,2	19 700	18	43	9	5	3	—	22
C 4	4 Tage bei 30° C	25	4,0	1 132	62	—	17	—	7	10	4
C 8		50	2,9	2 012	65	—	26	7	2	—	—
C 12		75	2,3	3 965	58	6	34	1	1	—	—
C 16		100	3,6	73 200	28	6	54	3	—	—	9
C 20		125	4,6	16 810	35	15	41	3	—	3	3
C 24		150	6,2	13 103	7	27	31	30	—	—	5
C 28		175	8,1	12 500	3	4	9	80	—	—	4
C 32		200	8,5	19 000	5	22	47	26	—	—	—

---

[1]) + = vorhanden, aber nicht prozentual faßbar.

7. Die Gruppe der Fluoreszierenden ist im angefeuchteten Sesammehl C nach unseren Versuchen erst nach 4 Tagen zu bedeutender Entwicklung gelangt. Ein größerer Wasserzusatz wirkt im allgemeinen fördernd auf diese Gruppe.

8. Die gasbildenden Milchsäurebakterien entwickeln sich im angefeuchteten Sesammehl C stets in sehr großer Zahl und werden nach einigen Tagen, namentlich bei höherer Temperatur, meist zu den vorherrschenden Arten.

9. Eine eigentliche, bald goldgelbe, bald schmutzigweiße, als „Brockenkolonie" bezeichnete Art ist für Sesammehlprobe C, wie für eine ganze Reihe anderer Proben charakteristisch. Ihre Hauptentwicklung liegt, wie bei den Kokken, im Anfangsstadium der Gärung. Bacterium Güntheri findet im Sesammehl C im allgemeinen nicht so günstige Existenzbedingungen wie in den Erdnußfuttermitteln.

5. Untersuchung von 10 weiteren Sesammehlproben.

Sesammehlproben D und E.

Probe D stammt vom Gutsbetriebe der landwirtschaftlichen Schule R. bei Z., Kt. Bern, und ging am 17. Januar 1910 ein. Makroskopisches Aussehen normal, feinmehlig, Geruch frisch, aromatisch.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesammehlprobe D		
Bakterienart	Zahl absolut	ca. %
Bacillus mesentericus	3 000	2
Bacillus subtilis	2 000	2
Bacillus megatherium	2 000	2
Bacillus tumescens	8 000	7
Bacillus oxalaticus	6 000	5
Bacterium fluorescens	1 000	1
Bacterium putidum	2 000	2
Bacterium levans	9 000	8
Bacterium punctatum	3 000	2
Gelber Säurebildner	3 000	2
Streptothrix chromogena	2 000	2
Streptothrix alba	3 000	2
Gelbe Sarcina	2 000	2
Langstäbchen, unbeweglich:		
gelb, mit Abstand zwischen den Zellen	2 000	2
rötlich, mit Abstand	1 000	1
farblos, „ „	3 000	2
„ ohne „	8 000	7
gelblich, „ „	6 000	5
Bewegl. Langstäbchen, nicht verflüssigend	6 000	5
Unbewegliches Kurzstäbch.:		
nicht verflüss., gelblich	10 000	9
gekerbter Kolonienrand	10 000	9
gelappter Kolonienrand	2 000	2
farblos	8 000	7
Bewegl. Kurzstäbch., verflüss.	5 000	4
„ „ ,wackelnd	5 000	4
Gelblicher Coccus	2 000	2
Coccus in farblosen Kolonien	2 000	2
Gesamtzahl	116 000	100

Sesammehlprobe E		
Bakterienart	Zahl absolut	ca. %
Bacillus mesentericus	90 000	15
Bacillus subtilis	10 000	2
Bacterium fluorescens	7 000	1
Bacterium putidum	3 000	1
Bacterium Zopfii	10 000	2
Bacterium herbicola aureum	6 000	1
Bacterium acidi lactici	4 000	1
Bacterium coli	2 000	—
Gelber Gasbildner	30 000	5
Gelber Säurebildner	3 000	1
Weiße Streptothrix	16 000	3
Bacillus tumescens	20 000	3
Streptococcus, gelb, langsam verflüssigend	2 000	—
Diplococcus, gelb, langs. verfl.	5 000	1
Diplococcus, weiß, nicht verfl.	10 000	2
„ klein, karminrot	4 000	1
Streptokokkenähnl. Bact. Güntheri	40 000	6
Bacterium Güntheri	160 000	27
Brockenkolonie, goldgelb	140 000	24
Sarcina, gelb	2 000	—
Kurzstäbchen, karminrot	8 000	1
Stäbchen, B. acidi lactici-ähnl., rosarote Kolonien	2 000	—
Stäbchen versch. Dimensionen	11 000	2
Bac. putrificus coli	3 000	1
Gesamtzahl	588 000	100

Probe E wurde am 7. Februar 1910 direkt von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Makroskopisches Aussehen der Probe tadellos; ganz frisch. Verarbeitung und Untersuchung der Proben D und E wie üblich.

Die Gesamtzahl der Bakterien ist in Probe D relativ klein; nämlich pro Gramm 116 000. Im ganz frischen, direkt von der Fabrik bezogenen Material findet sich eine rund fünfmal größere Zahl. Bemerkenswert ist in vorstehenden beiden Proben die große Mannigfaltigkeit der Arten, da in Probe E nicht weniger als 24, in Probe D sogar 27 verschiedene Spezies nachgewiesen werden konnten und zudem ist mit Bestimmtheit anzunehmen, daß das Untersuchungsmaterial noch eine bedeutend größere Zahl von Arten barg, die der Untersuchung entgingen resp. in einer für den Nachweis zu geringen Zahl vorhanden waren. Denn alle jene Arten, welche weniger als 1000 Keime pro Gramm Sesammehl zählten, mußten unberücksichtigt bleiben, aus dem einfachen Grunde, weil sie infolge der großen Konkurrenz nicht zur Geltung kamen, hauptsächlich aber deswegen, weil sich die Kulturen, in welche mehr als $^{1}/_{1000}$ g Impfmaterial gebracht wurde, infolge viel zu dichter Besetzung als zur Untersuchung ungeeignet erwiesen. Zur Isolierung dieser Arten müßten Spezialverfahren angewendet werden. Aber auch schon in dieser beschränkten Zahl erweist sich der Keimgehalt vorstehender zwei Proben als ein eigentliches Sammelsurium von einzelnen Arten. Die nähere Bestimmung und die Benennung der unbekannten und auch der Literatur, soweit diese uns zugänglich war, noch fremden Spezies, muß einer besonderen Untersuchung vorbehalten bleiben.

Sesammehlproben F und G.

Probe F wurde uns durch gefällige Vermittlung von Herrn E. Ch. aus Moudon, Kt. Waadt, übermittelt. Beschaffenheit normal. — Probe G ging durch Herrn H. K. von Thun, Kt. Bern, ein. Makroskopisches Aussehen sehr gut. Verarbeitung am 8. April 1910.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesammehlprobe F			Sesammehlprobe G		
Bakterienart	Zahl absolut	%	Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus	150 000	30	Bacillus mesentericus	40 000	11
Bacillus subtilis	120 000	24	Bacterium fluorescens	20 000	6
Bacillus megatherium	20 000	4	Bacterium putidum	20 000	6
Bacterium fluorescens	60 000	12	Bacterium coli	14 000	4
Bacterium putidum	20 000	4	Bacterium acidi lactici	40 000	11
Bacterium coli	40 000	8	Bacterium aërogenes	30 000	8
Bacterium acidi lactici	30 000	6	Bacterium Zopfii	1 000	—
Gelber Gasbildner	20 000	4	Kokken in weißen Kolonien	10 000	3
Faltenkolonie, gelb	20 000	4	Streptokokken, sehr klein	130 000	36
Unbekannte Kurzstäbchen	10 000	2	Stäbchen schlank, sporenlos	40 000	11
„ Langstäbchen	10 000	2	Bacterium Güntheri	5 000	1
Gesamtzahl	500 000	100	Unbew., dicke Kurzstäbchen	10 000	3
			Gesamtzahl	360 000	100

Der Bakteriengehalt der beiden Proben ist ein quantitativ mittelmäßiger zu nennen. Bei der Probe F ist die sehr große Zahl von Bacillus mesentericus bemerkenswert. Dieser Mikroorganismus erreicht mit seinem nahen Verwandten, dem Bacillus subtilis, 54 Proz. der gesamten Keimzahl. Bei Probe G fällt das Schwergewicht auf die Kokkenflora. Beiderorts befinden sich die Fluoreszierenden in einer bedeutenden Zahl vor. Das Bact. Güntheri, das in der Mikroflora des Sesammehles im allgemeinen sonst vielfach zurückzutreten pflegt, findet sich in Probe G mit 5 Proz. vertreten.

Sesammehlproben H und I.

Probe H erhielten wir von A., Kt. Waadt; es war gemahlener Sesamkuchen. Aussehen des Untersuchungsmaterials normal. Eingang am 12. Februar 1910. Probe I wurde uns durch gefällige Vermittlung von Herrn J. B. aus Solothurn zugesandt. Makroskopisches Aussehen normal; das Mehl war sehr fein. Eingang am 29. Januar 1910.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesammehlprobe H		
Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	50 000	34
Bacillus subtilis	25 000	17
Bacillus megatherium . . .	3 000	2
Bacterium fluorescens . . .	2 000	1
Bacillus tumescens	5 000	4
Bacillus oxalaticus	3 000	2
Bacterium Zopfii	10 000	7
Bacterium vulgare	4 000	3
Bacterium coli	100	—
Bacterium acidi lactici . . .	500	—
Gelber Gasbildner	400	—
Weiße Streptothrix	20 000	14
Coccus in weißen Kolonien .	6 000	4
Typische gelbe Sarcina . .	3 000	2
Langstäbchen mit großem Abstand, nicht verflüssigend	8 000	6
Langstäbchen, ohne Abstand, verflüssigend	3 000	2
Bacillus putrificus coli . . .	3 000	2
Gesamtzahl	146 000	100

Sesammehlprobe I		
Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus vulgat.	100 000	31
Bacillus mesentericus ruber	20 000	6
Bacillus subtilis	3 000	1
Bacillus megatherium . . .	1 000	—
Bacterium Zopfii	50 000	16
Bacillus tumescens	20 000	6
Bacterium acidi lactici . . .	10 000	3
Gelber Gasbildner, involviert	20 000	6
Goldgelbe „Faltenkolonie" .	4 000	1
Plectridien, große, gelbe Kolon.	30 000	9
Streptothrix, weiß	4 000	1
Kokken, groß, weiß, nicht verflüssigend	3 000	1
Kokken, groß, gelb, langsam verflüssigend	20 000	6
Streptokokken	30 000	9
Stäbchen, ziegelrote Kolonien	1 000	1
Kurzstäbchen, sehr klein, weiße Kolonien	2 000	1
Bacillus putrificus coli . . .	6 000	2
Gesamtzahl	324 000	100

Im Sesammehl H finden sich außer den hier angegebenen Spaltpilzarten noch rund 26 000 entwicklungsfähige Zellen von Schimmelpilzen (Mucor) pro Gramm vor. Von den Bakterien sind auch hier wieder die sogenannten Heu- und Kartoffelbazillen sehr stark vertreten (51 Proz.). Doch ist bemerkenswert, daß sowohl Bacillus mesentericus als auch Bacillus subtilis mehr oder weniger deutliche Degenerationserscheinungen zeigen, indem das Peptonisierungsvermögen bei vielen Individuen und deren Nachkommen sehr stark reduziert, in manchen Fällen sogar ganz verschwunden ist. Im übrigen jedoch zeigen die Organismen noch alle die typischen, charakteristischen Eigenschaften.

In Probe I findet sich ausnahmsweise der Bacillus mesentericus ruber, den wir bis dahin noch in keiner Futtermittelprobe beobachten konnten. Zu erwähnen ist hier auch das verhältnismäßig starke Auftreten einer weißen Streptothrichae, einer übrigens im Sesammehl nicht ungewöhnlichen Erscheinung. Das Bacterium Zopfii und der

Bacillus putrificus coli weisen darauf hin, daß voraussichtlich sowohl in Probe H als in Probe I früher vorübergehend eine Eiweißzersetzung stattgefunden hat.

Sesammehlproben K u. L.

Die Probe K ging am 12. Februar 1910 von Moudon, Kt. Waadt, durch gefl. Vermittlung von Herrn E. Ch. ein. Aussehen normal, ziemlich grobkörnig, Geruch aber deutlich brenzlich. — Probe L wurde am 31. März durch Herrn Dr. J. K. von Bern erhalten. Aussehen der Probe normal. — Verarbeitung und Untersuchung beider Proben nach bekannter Methode.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesammehl K			Sesammehl L		
Bakterienart	Zahl absolut	%	Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus	50 000	26	Bacillus mesentericus	500 000	58
Bacillus subtilis	10 000	5	Bacillus subtilis	200 000	24
Bacillus megatherium	20 000	11	Bacillus mycoides	1 000	—
Bacterium fluorescens	1 000	1	Bacillus megatherium	1 000	—
Bacillus tumescens	3 000	2	Bacterium coli	2 000	—
Bacillus oxalaticus	4 000	2	Bacterium acidi lactici	70 000	8
Bacterium acidi lactici	10 000	5	Bacterium Güntheri	19 000	2
Bacterium aërogenes	5 000	3	Brockenkolonie	10 000	1
Streptothrix, weiß	20 000	11	Bacterium herbicola aureum	2 000	—
Sproßpilz	3 000	2	Sproßpilz, weiß	20 000	3
Coccus, gelb, nicht verflüssig.	4 000	2	Rosaroter Sproßpilz	3 000	—
Coccus, weiß, verflüssigend	20 000	11	Coccus, weiß, verflüssigend	1 000	—
Bacterium herbicola aureum	2 000	1	„ nicht verflüssigend	10 000	1
Langstäbch., unbek., m. groß. Abstand zwisch. d. Zellen	6 000	3	Diplococcus, nicht verflüss.	20 000	3
Bacterium Zopfii	20 000	11	Gesamtzahl	859 000	100
Bacillus putrificus coli	7 000	4			
Gesamtzahl	185 000	100			

Probe K hat zwar eine mehr als 4 mal kleinere Keimzahl als Probe L; aber wegen des Vorkommens einer größeren Zahl von eiweißzersetzenden Arten ist sie hygienisch entschieden bedenklicher, als das keimreiche Sesammehl L. Dieser Umstand bildet wieder einen Beweis dafür, daß bei der Qualitätsbestimmung eines Futtermittels die absolute Zahl der enthaltenen Bakterien nicht ausschließlich maßgebend ist. — Wichtiger noch ist es zu ermitteln, welche Arten im betreffenden Futtermittel vorhanden sind.

In der Probe L kommt ausnahmsweise auch das Bacterium Güntheri vor. Diese Art zeigt aber deutliche Degenerationserscheinungen. Das Säurebildungsvermögen ist beinahe eingebüßt. In Reinkultur bei 30° C vermochte Bacterium Güntheri nach 4 Tagen die Milch nicht mehr zur Gerinnung zu bringen. Der Säuregrad der geimpften Milch betrug nur 5,3 ccm n/10 NaOH.

Sesammehlprobe M u. N.

Probe M: Eingang am 31. März 1910 durch gefl. Vermittlung von Herrn A. St. von einer landwirtschaftlichen Genossenschaft der Zentralschweiz in S.. Aussehen der Probe normal.

Probe N wurde direkt von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Aussehen tadellos. Verarbeitung am 31. März 1910.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesammehl M Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	400 000	40
Bacillus megatherium . . .	20 000	2
Bacterium acidi lactici . . .	30 000	3
Bacterium Güntheri	50 000	5
Langsam verflüss. Kokken .	5 000	1
Diplococcus, groß, nicht verfl.	30 000	3
Gelber Gasbildner	20 000	2
Brockenkolonie (goldgelb). .	170 000	17
Stäbchen, ziegelrot, unbek. .	20 000	2
Stäbchen, weiße Kolonien .	20 000	2
Streptothrix, weiß	80 000	8
Streptothrix chromogena . .	10 000	1
Bacterium herbicola aureum	10 000	1
Stäbchen, schlank, karminrot	120 000	12
Bacillus putrificus coli . . .	9 000	1
Gesamtzahl	994 000	100

Sesammehl N Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	550 000	65
Bacterium acidi lactici . . .	5 000	1
Bacterium Güntheri	3 000	—
Gelber Gasbildner	20 000	2
Gelber Säurebildner	200 000	23
Bacterium herbicola aureum	10 000	1
Brockenkolonie, gelblich . .	5 000	1
Bacillus putrificus coli . . .	60 000	7
Gesamtzahl	853 000	100

Wie in den früheren, so tritt auch in den beiden vorstehenden Proben der Bacillus mesentericus als weitaus häufigste Art auf. Dieser Organismus war überhaupt in allen von uns untersuchten Sesammehlproben in größerer oder geringerer Zahl vertreten und scheint also ein beständiger Bewohner des Sesammehles zu sein. — Auch die Gruppe der Milchsäurebakterien, Gasbildner und Nichtgasbildner, ist in den Proben M und N vertreten.

Von Wichtigkeit ist, wie wir früher schon des öftern nachzuweisen Gelegenheit hatten, das relativ starke Auftreten von Bacillus putrificus coli, der in Probe N mit 60 000 Keimen pro Gramm in bezug auf quantitative Vertretung sogar an dritter Stelle steht.

Was die Gesamtzahl der Keime betrifft, weisen die Proben M und N maximale Zahlen auf. Probe M ist mit 994 000 Keimen pro Gramm das pilzreichste Sesammehl.

Zusammenstellung der wichtigsten Arten der Proben D—N.

Probe	Gesamtkeimzahl	Zahl der Arten	Vertretung der einzelnen Arten in % Bac. mesentericus + subtilis	Fluoreszierende	Milchsäurebakterien	Gelb. Gas- u. Säurebildner	Brockenkolonien	Kokken	Rest	Total
D	116 000	27	4	3	+1)	2	—	4	87	100
E	588 000	24	17	2	1	6	24	10	40	100
F	500 000	11	54	16	14	4	—	+	12	100
G	360 000	12	11	12	24	+	+	39	14	100
H	146 000	17	51	1	+	+	+	4	44	100
I	324 000	17	38	+1)	3	6	+	16	37	100
K	185 000	16	31	1	8	—	—	13	47	100
L	859 000	14	82	—	10	—	1	4	3	100
M	994 000	15	40	—	8	2	17	4	29	100
N	853 000	8	65	—	1	25	1	—	8	100
Mittel	492 500	16,1	39,3	3,5	6,9	4,5	4,3	9,4	32,1	100

---

1) + bedeutet: Nachweisbar, aber in kleinerer Menge als ½% der Gesamtzahl.

Ergebnisse: Die Keimzahl im Sesammehl schwankt innert bedeutenden Grenzen. Sie ist im allgemeinen nicht sehr hoch. — Die qualitative Zusammensetzung der Flora ist sehr kompliziert; die weitaus häufigsten Vertreter gehören der Mesentericus-subtilis-Gruppe an. Bacillus putrificus coli kommt in ungefähr der Hälfte aller untersuchten Proben vor. Die gasbildenden Milchsäurebakterien sind ziemlich regelmäßig, Bacterium Güntheri jedoch ist nur mehr zufällig und in untergeordneter Quantität vertreten.

Sesamkuchenproben.

Im ganzen wurden 11 Proben von Sesamkuchen untersucht. Probe A wurde, ganz analog der Sesammehlprobe A, eingehend behandelt, während bei Sesamkuchen B die Bakterienflora in 12 verschiedenen Gärstadien quantitativ und qualitativ ermittelt wurde. Bei den übrigen 9 Proben wurde die Untersuchung auf die Ermittlung des Bakteriengehaltes des frischen Materials beschränkt.

6. Eingehende Untersuchung der Sesamkuchenprobe A.

I. Untersuchung von Sesamkuchen A frisch und in gärendem Zustande.

Herkunft der Probe: Sie ging am 12. Dezember 1909 durch gefl. Vermittlung von Herrn J. B. aus L. b. Yverdon, Kt. Waadt, ein. Aussehen der Probe sehr gut; Farbe hellbraun, Geruch aromatisch, Konsistenz mittelhart, krümelig.

Übersicht der Verarbeitung: Siehe Erdnußmehl A, p. 97 und 98.

Mikroskopischer Befund beim frischen Sesamkuchen A.
(Bakterienzahl pro g.)

Bakterienart	absolut	in %
Bacillus mesentericus	25 000	17
Bacillus mycoides	2 000	1
Bacillus megatherium	3 000	2
Bacillus tumescens	10 000	7
Bacterium acidi lactici	6 000	4
Gelber Gasbildner.	5 000	3
Bacterium Zopfii	10 000	7
Weiße Streptothrix	40 000	26
Diplococcus, groß, weiß	20 000	13
„ klein, weiß	20 000	13
Kleines, unbekanntes Kurzstäbchen. .	8 000	5
Buttersäurebacillus, unbeweglich . . .	3 000	2
Gesamtzahl	152 000	100 %.

Die Verarbeitung der Sesamkuchen geschah wie folgt: Das zu untersuchende Stück wurde mit sterilem Messer ringsum von der äußersten Schicht befreit. Dann wurden vom bloßgelegten inneren Teil kleine Brocken in eine sterile Glasdose abgeschnitten, hierauf genau 2 Gramm abgewogen, in ausgeflammtem Tiegel zerrieben und auf die bekannte Weise weiter verarbeitet.

Was nun das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung von Sesamkuchen A betrifft, so muß die genannte Probe als verhältnismäßig keimarm bezeichnet werden. Es überwiegt, wie bei den Sesammehlen, auch hier Bacillus mesentericus, der ausnahmsweise in Sesamkuchen A in stark schleimbildender Form auftritt. Auffallend groß ist auch die Zahl einer weißen Streptothrichae. Dieser Pilz wurde auch in den Sesammehlproben sehr häufig nachgewiesen. Die obige Probe enthielt 12 verschiedene Arten. Außerdem fand sich in größerer Menge noch Penicillium glaucum vor.

Sesamkuchen A, angefeuchtet in gärendem Zustande.

Herstellung der Proben: Abschaben der äußersten, möglicherweise sekundär infizierten Schichte mit abgeflammtem Messer; Zerschneiden des Kuchens in eine grobkörnige Masse, Abwägen von 20 g und Anfeuchten mit 40 g sterilem Wasser. Weitere Verarbeitung der Proben, Herstellen der Kulturen und Untersuchen der Proben auf übliche Weise.

Serie 1.

Sesamkuchen A, angefeuchtet bei 37° C.

Benennung der Proben:

S I a = Sesamkuchen A, angefeuchtet 24 Std. bei 37° C
S I b = „ A, „ 48 „ „ 37° C
S I c = „ A, „ 5 Tage „ 37° C.

Makroskopisches Aussehen:

S I a schwach gelblich verfärbt, auf der Oberfläche Wucherung des Bacillus mesentericus, schwacher Schimmelanflug, ganz schwache Ammoniakproduktion.

S I b: Deutlich gelb verfärbt, auf der Oberfläche Wucherung des Bacillus mesentericus, deutliche Ammoniakdämpfe, beim Umrühren ist die Masse stark fadenziehend.

S I c: Stark ockergelb verfärbt, viel Bacillus mesentericus.

Mikroskopischer Befund
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenen Sesamkuchens berechnet).

Bakterienart	S I a		S I b		S I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	4	1	380	16	3800	82
Bacterium fluorescens . . .	—	—	80	4	—	—
Bacterium coli	40	5	50	2	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	30	4	30	1	100	2
Bacterium Güntheri	300	39	1500	67	600	13
Gelber Gasbildner	200	25	80	4	28	1
Weiße Streptothrix	—	—	20	1	—	—
Faltenkolonie (gelbl.) . . .	10	1	—	—	—	—
Buttersäurebacillen, unbew. .	3	—	20	1	—	—
Bacillus putrificus coli . . .	—	—	—	—	20	—
Diplokokken	200	25	100	4	100	2
Gesamtzahlen	787	100	2260	100	4648	100

Untersuchungsergebnisse: Starke und andauernde Keimzahlzunahme; weit überwiegend wird Bacillus mesentericus, der vorerst wohl prozentual, nicht aber absolut einen erheblichen Rückgang aufweist, vom zweiten Tage an jedoch mächtig überhand nimmt und nach 5 Tagen sogar 82 Proz. der gesamten Keimzahl erreicht. — Die Fluoreszenten weisen eine sehr bescheidene Frequenz auf. Die Gasbildner setzen gleich anfangs mit der Vermehrung sehr intensiv ein, verlieren aber im weiteren Verlauf der Gärung mehr und mehr an Bedeutung. Das Bacterium Güntheri hat schon mit dem zweiten Tag sein Maximum erreicht. Es ist, obwohl im frischen Kuchen nicht nachweisbar, schon nach 24 Stunden mit 39 Proz., nach 48 Stunden aber mit 67 Proz. vertreten. Je mehr nun diese Art, die sich hier durch ein schwaches Säureproduktionsvermögen auszeichnet, abnimmt, desto mehr nimmt Bacillus mesentericus zu.

Serie 2.

Sesamkuchen A, angefeuchtet bei 22° C.

Benennung

S II a = Sesamkuchen A, angefeuchtet 24 Std. bei 22° C
S II b = „ A, „ 48 „ „ 22° C
S II c = „ A, „ 5 Tage „ 22° C.

Makroskopisches Aussehen der Proben:

S II a noch kaum wesentlich verändert, keine Schimmelpilze.

S II b: Masse schwach bräunlich verfärbt, an der Oberfläche in einen mehr gelblichen Ton übergehend, Geruch schwach säuerlich, an der Oberfläche ein zarter Schimmelanflug und einige Anhäufungen von Bacillus mesentericus.

S II c: Ganze Masse schwach gelb verfärbt, an der Oberfläche ein schwacher Mucor ansatz, Geruch nach Ammoniak, daneben deutlich säuerlich.

Mikroskopischer Befund
(Keimzahlen in Millionen pro g lufttrockenen Sesamkuchens).

Bakterienart	**S II a**		**S II b**		**S II c**	
	absolut	**%**	**absolut**	**%**	**absolut**	**%**
Bacillus mesentericus. . . .	**300**	**15**	**30**	**2**	**—**	**—**
Bacterium fluorescens . . .	**500**	**25**	**—**	**—**	**80**	**3**
Bacterium coli	**—**	**—**	**90**	**4**	**120**	**4**
Bacterium acidi lactici . . .	**10**	**—**	**200**	**9**	**70**	**3**
Bacterium Güntheri	**100**	**5**	**20**	**1**	**900**	**34**
Gelber Gasbildner	**500**	**25**	**700**	**34**	**1100**	**41**
Gelber Säurebildner	**—**	**—**	**500**	**25**	**300**	**11**
Kokken	**100**	**5**	**350**	**17**	**100**	**4**
Faltenkolonien (Hirnstruktur)	**—**	**—**	**160**	**8**	**—**	**—**
Weiße Streptothrix	**200**	**10**	**—**	**—**	**—**	**—**
Sproßpilz	**300**	**15**	**—**	**—**	**—**	**—**
Gesamtzahlen	**2010**	**100**	**2050**	**100**	**2670**	**100**

Ergebnisse: Erst sehr rasche, dann langsame, aber bis zum Schlusse des Versuchstermins anhaltende Zunahme des Keimgehaltes. Die Vermehrungsquotienten, bezogen auf den ursprünglichen Keimgehalt, betragen: nach 1 Tag 13 223; nach 2 Tagen 13 486; nach 5 Tagen 17 565. — Bacillus mesentericus nimmt, im Gegensatz zu seinem Verhalten bei 37° C, beständig an Zahl ab; die Gasbildner dagegen nehmen stark zu. Der Sproßpilz und die Streptothrichae sind schon nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Bact. Güntheri erfährt, nach vorübergehendem Zurückweichen nach 48 Stunden, eine bedeutende Zunahme.

II. Wirkung von gärendem Sesamkuchen A auf frische Konsummilch.

Die für die Impfzwecke verwendete Milch wurde am 5. Mai 1910 vom Gute „Strickhof" bei Zürich abgeholt und sofort nach der Ankunft im Laboratorium auf die übliche Weise verarbeitet. Zudem wurde in 24 sterilisierte Erlenmeyerkölbchen von 150 ccm Inhalt je 100 ccm der frischen Milch abgemessen. 3 der so hergestellten Portionen wurden als Kontrollproben (bei 37°, 22° und 12° C) benutzt; von den übrigen 21 wurden je 3 sofort mit den oben untersuchten gärenden Sesamkuchenproben S I a, S I b, S I c, S II a, S II b und S II c und mit frischem Material A geimpft. Je eine der auf diese Weise hergestellten Proben wurde zu 37° C, 22° C und 12° C verbracht. Nach Eintritt der makroskopischen Veränderung wurden die Milchproben jeweils untersucht.

Serie 3.

Konsummilch frisch und die Kontrollproben.

Bezeichnung der Konsummilch = St. M.; Verarbeitung auf die übliche Weise.

Bakteriologischer Befund pro ccm.

Bacillus mesentericus	3 000 =	8 %
Bacterium fluorescens	1 000 =	3 %
Bacterium acidi lactici	3 000 =	8 %
Bacterium Güntheri	2 000 =	6 %
Verschiedene Kokken	24 000 =	67 %
Unbekanntes, schlankes Stäbchen	3 000 =	8 %
Gesamtzahl	36 000 =	100 %

Kontrollmilchproben, Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	K a	K b	K c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	42 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen .	schwach gebläht, feinflockig geronnen	kein Gas, gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	kaum deutlich sauer	rein sauer	kaum ausgeprägt sauer
Säuregrad	10,2 n/10 NaOH	13,0 n/10 NaOH	10,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	K a		K b		K c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	500	36	370	42
Bacterium coli	5	4	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	20	15	3	—	4	1
Bacterium Güntheri	103	79	900	64	400	46
Verschiedene Kokken . . .	—	—	6	—	100	11
Buttersäurebacillus, unbew. .	2	2	—	—	—	—
Gesamtzahlen	130	100	1409	100	874	100

Resultate: Überall sehr starke Bakterienvermehrung; höchste Keimzahl bei 22° C; im Verlaufe der Gärung treten die Kokken bei höherer Temperatur zurück; bei 12° C aber finden sie sich in recht ansehnlicher Zahl. Bacterium Güntheri ist hier bei 37° C am relativ stärksten vertreten, absolut hingegen bei 22° C. Die Fluoreszenten gewinnen mit sinkender Temperatur an Bedeutung.

Serie 4.

Frische Konsummilch, geimpft mit frischem Sesamkuchen A.

Herstellen und Impfen der Proben wie üblich.

Untersuchungsresultate siehe auf der folgenden Seite.

Ergebnisse: Ein Vergleich dieser Proben mit den analogen Kontrollmilchproben zeigt uns: Bei 37° C etwas früheres Eintreten der makroskopischen

Veränderung, höherer Säuregrad und erheblich größerer Bakteriengehalt der geimpften Milch. In qualitativer Hinsicht ist kein durchgreifender Unterschied in der Flora wahrzunehmen.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung	M I	M II	M III
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17 Stunden	30 Stunden	4¼ Tage
Makroskopisches Aussehen	gallertig-ziegerig geronnen	gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	säuerlich-bitter	rein sauer	kaum säuerlich, stark bitter
Säuregrad	13,3 n/10 NaOH	10,2 n/10 NaOH	13,6 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I		M II		M III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	200	24	6200	98
Bacterium putidum	—	—	—	—	40	1
Bacterium coli	55	18	1	—	—	—
Bacterium acidi lactici	13	4	5	—	8	—
Bacterium Güntheri	235	78	600	70	20	1
Kokken	—	—	40	5	—	—
Sarcina, zitronengelbe Kol.	—	—	10	1	—	—
Gesamtzahlen	303	100	856	100	6268	100

Bei 22° C ist die Kontrollmilch bakterienreicher als die geimpfte Probe, welcher Umstand wohl der verlängerten Gärdauer zuzuschreiben ist. Die Spaltpilzflora in der geimpften Milch und in der Kontrollmilch ist qualitativ annähernd die nämliche. —

Der größte Unterschied zwischen der geimpften und der ungeimpften Probe zeigt sich bei 12° C. Hier hat die Zugabe von frischem Sesamkuchen eine ungemein üppige Entwicklung des Bacterium fluorescens auf Kosten des Bacterium Güntheri herbeigeführt. Dieser Spaltpilzart ist wohl auch der Bittergeschmack der Milch zuzuschreiben.

Zusammenfassend können wir sagen, daß frischer Sesamkuchen in der in unseren Versuchen eingeimpften Menge von $^1/_{100}$ g auf 100 ccm Milch auf gewöhnliche Konsummilch zwar keinen allgemeinen und durchgreifenden Einfluß auszuüben vermag, daß aber, wo eine Einwirkung sich geltend macht, diese deutlicher bei 37° C und bei 12° C als bei 22° C in die Erscheinung tritt.

Serie 5.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 24 Stunden bei 37° C war. (Vergl. S I a, p. 200).

Herstellung und Verarbeitung der Proben wie üblich.

Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M Ia	M Ib	M Ic
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	29 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen	stark gebläht, käsig-ziegerig geronnen	leicht gallertig geronnen, Gas	ganz feinflockig geronnen, schwach Gas
Geschmack	schwach säuerlich	schwach säuerlich	sehr stark bitter
Säuregrad	9,6 n/10 NaOH	10,1 n/10 NaOH	12,3 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Zahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M I a		M I b		M I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	8	1	—	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	20	3	2600	74
Bacterium putidum	—	—	10	1	100	3
Bacterium coli	100	6	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	500	31	20	3	200	6
Bacterium aërogenes	300	18	60	8	—	—
Bacterium Güntheri	400	25	600	82	600	17
Gelber Gasbildner	300	18	20	3	—	—
Gelber Säurebildner	20	1	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1628	100	730	100	3500	100

Ergebnisse: Die Impfung bewirkte neben einer um rund das 12-fache vermehrten Keimzahl bei Probe M I a eine starke Überhandnahme der Gasbildner auf Kosten des Bacterium Güntheri. Die Gruppe der Gasbildner beansprucht bei der Kontrollprobe bloß 19 Proz., bei Probe M I a dagegen 73 Proz. des Gesamtkeimgehaltes.

Wird die Milch bei 22° C aufbewahrt, so ist eine Einwirkung des Impfmaterials nicht so deutlich, ja die Keimzahl sogar eine kleinere in der geimpften Milch. Bei 12° C dagegen werden, außer einer Vervierfachung der Keimzahl durch die Impfung, die Fluoreszierenden bedeutend gefördert. Der Kokkenbestand der Stammflora aber wird in der Milch gänzlich unterdrückt.

Serie 6.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war (vgl. Probe SIb p. 200).

Herstellung, Verarbeitung und Untersuchung der Proben wie üblich.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M IIa	M IIb	M IIc
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	28 Stunden	3¼ Tage
Makroskopisches Aussehen .	Blähung, käsig-ziegerig geronnen	locker-gallertig geronnen	schwach gebläht, feinflockig geronnen
Geschmack	nur schwach sauer	unrein sauer, talgig	säuerlich, stark bitter
Säuregrad	10,8 n/10 NaOH	12,2 n/10 NaOH	14,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M II a		M II b		M II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	—	—	3	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	200	5	1400	57
Bacterium putidum	—	—	—	—	20	1
Bacterium coli	50	4	110	2	200	8
Bacterium acidi lactici . . .	40	3	200	5	300	12
Bacterium Güntheri	1200	92	3700	86	500	21
Gelber Gasbildner	20	1	2	—	—	—
Gelber Säurebildner	+	—	—	—	—	—
Kokken	—	—	100	2	—	—
Weiße Streptothrix	—	—	—	—	30	1
Gesamtzahlen	1310	100	4312	100	2453	100

Es wurde in vorstehenden Proben pro Kubikzentimeter Milch 226000 Keime eingeimpft, wovon 38000 dem Bacillus mesentericus angehörten. Diese Spezies ist nun in der Milch bei 37° C und 22° C von andern Arten vollständig überwuchert worden und bei 12° C war sie in nur geringer Menge nachweisbar. Die Gesamtkeimzahl wurde durch das Impfmaterial überall ansehnlich erhöht. Dagegen ist in qualitativer Hinsicht kein großer Einfluß festzustellen. Nur dem Bacterium Güntheri wurde durch die Impfung eine wesentliche Förderung zuteil.

Serie 7.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war (vergl. Probe S I c, p. 200).

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M IIIa	M IIIb	M IIIc
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17 Stunden	30 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	Blähung, käsig geronnen	gallertig geronnen, Gas	gallertig geronnen
Geschmack	unrein säuerlich	normal	säuerlich, schwach bitter
Säuregrad	12,4 n/10 NaOH	13,5 n/10 NaOH	13,5 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M III a		M III b		M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	2	—	2	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	90	7	500	11
Bacterium putidum	—	—	30	2	230	5
Bacterium acidi lactici . . .	150	13	100	7	100	2
Bacterium aërogenes	100	9	200	15	100	2
Bacterium Güntheri	900	78	900	68	3600	80
Gelber Gasbildner	—	—	5	1	3	—
Gesamtzahlen	1150	100	1327	100	4535	100

Ein Vergleich mit den korrespondierenden Kontrollproben ergibt folgendes: Bei 22° C bedeutend früher eingetretene makroskopische Veränderung bei der gimpften Probe; bei 37° C und 12° C besteht diesbezüglich keine deutliche Einwirkung; ferner ergibt sich eine größere Keimzahl in der geimpften Milch bei 37° C und bei 12° C als in den analogen, nicht geimpften Proben. Qualitativ ist bei 37° C kein wesentlicher Einfluß durch die Impfung festzustellen; bei 22° C aber tritt deutlich die Tendenz einer Begünstigung der Gasbildner auf Kosten des Bacterium Güntheri zutage. Bei 12° C hingegen werden die in der Regel sehr reichlich auftretenden Fluoreszenten durch Überhandnahme des Bacterium Güntheri in der geimpften Probe überflügelt.

Serie 8.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war. (Vergl. Probe S II a, p. 201.)

Untersuchungsresultate siehe folgende Seite.

Trotzdem im Impfmaterial von der Gesamtflora 15 Proz. dem Bacillus mesentericus zugehörten, vermochte dieser Spaltpilz in der bei

37° C aufbewahrten Milch nur in bescheidener Menge aufzukommen, bei 22° und 12° C aber gar nicht. Das Bacterium Güntheri aber, das in der frischen Milch mit 6 Proz., im Impfmaterial mit 5 Proz. vertreten war, gewann sowohl bei 37° C als bei 22° C die Oberhand. Das Bacterium fluorescens wurde bei 37° C ganz unterdrückt; bei 22° C zeigt es eine ansehnliche Entwicklung, während bei 12° C ein eigentliches Überwuchern dieser Art beobachtet werden kann. — Die Kokken, die ursprünglich mit 67 Proz. in der Konsummilch nachgewiesen wurden, vermochten sich einzig bei 12° C und auch hier nur in ganz bescheidener Menge, zu halten. — Es macht sich also überall die Tendenz einer starken Auslese geltend.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M IV a	M IV b	M IV c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17 Stunden	30 Stunden	4½ Tage
Makroskopisches Aussehen	Blähung, ziegerig geronnen	gallertig geronnen	feinflockig geronnen
Geschmack	schwach säuerlich	schwach sauer	säuerlich-bitter
Säuregrad	7,5 n/10 NaOH	12,0 n/10 NaOH	13,7 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M IV a		M IV b		M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus	10	2	—	—	—	—
Bacterium fluorescens	—	—	140	14	1300	79
Bacterium coli	80	14	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici	90	15	40	4	—	—
Bacterium Güntheri	400	69	800	79	300	18
Gelber Gasbildner	—	—	30	3	30	2
Kokken	—	—	—	—	10	1
Gesamtzahlen	580	100	1010	100	1640	100

Serie 9.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C war. (Vergl. Probe S II b, p. 201.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M V a	M V b	M V c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	40 Stunden	4¾ Tage
Makroskopisches Aussehen	stark gebläht, käsig geronnen	feinflockig bis gallertig geronnen	ganz feinflockig geronnen
Geschmack	schwach säuerlich	unrein säuerlich	säuerlich, stark bitter
Säuregrad	8,9 n/10 NaOH	12,5 n/10 NaOH	11,9 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Ergebnisse: Die makroskopische Veränderung trat in den geimpften Proben bei 37° C und bei 22° C um 2 Stunden früher ein, als bei den analogen Kontrollproben. Bei 12° C aber zeigte die Kontrollmilch eine frühere makroskopische Veränderung, als die korrespondierende geimpfte Milch. — Die Gesamtkeimzahl ist, trotz der abgekürzten Gärdauer, bei den geimpften Proben um das 3—7-fache größer. Dagegen zeigt die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora sehr unbedeutende Abweichungen; nur erscheint das Verhältnis der prozentuellen Vertretung in der geimpften Milch bei 37° C zugunsten der Gasbildner, bei 22° C zugunsten des Bacterium Güntheri bedeutend verschoben.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M V a		M V b		M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	20	2	—	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	200	4	400	13
Bacterium coli	30	3	100	2	30	1
Bacterium acidi lactici . . .	240	26	80	2	300	9
Bacterium aërogenes	130	14	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	400	44	4200	91	2400	76
Gelber Gasbildner	100	11	50	1	25	1
Sarcina in gelben Kolonien .	—	—	10	—	—	—
Gesamtzahlen	920	100	4640	100	3155	100

Serie 10.

Frische Konsummilch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war. (Vergl. Serie 2, Probe S II c, p. 201.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	M VI a	M VI b	M VI c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	17 Stunden	30 Stunden	4 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	gebläht, ziegerig-käsig geronnen	viel Gas, gallertig geronnen	gallertig geronnen
Geschmack	unrein säuerlich	sauer-bitter	sauer mit deutlich bitterem Nachgeschmack
Säuregrad	10,5 n/10 NaOH	12,5 n/10 NaOH	14,1 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	M VI a		M VI b		M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	10	2	400	19
Bacterium putidum	—	—	—	—	100	5
Bacterium coli	3	1	30	5	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	40	6	130	24	100	5
Bacterium Güntheri	600	90	240	44	1500	71
Gelber Gasbildner	20	3	120	22	—	—
Gelber Säurebildner	—	—	15	3	—	—
Gesamtzahlen	663	100	545	100	2100	100

Auffallend ist hier die verhältnismäßig geringe Keimzahl der Probe M VI b. Es konnten pro Kubikzentimeter nicht einmal so viele Bakterien nachgewiesen werden wie bei 37° C, eine Erscheinung, die wir bisher noch nie beobachteten. Vielleicht ist dieser Umstand der relativ geringen Vertretung des Bacterium Güntheri und der dadurch ermöglichten Überhandnahme der Gasbildner zuzuschreiben.

In den beiden Proben M VI a und M VI c haben die nichtgasbildenden Milchsäurebakterien, wie dies bisher normalerweise immer der Fall war, die Oberhand. Gänzlich eliminiert wurden in obiger Serie 10 Bacillus mesentericus und die Kokken.

III. Wirkung von Sesamkuchen A, in frischem und gärendem Zustande, auf sterile Milch.

Die Gewinnung der zu diesen Versuchsserien benutzten sterilen Milch geschah wie im allgemeinen Teile p. 13 eingehend beschrieben ist.

Serie 11.

Sterile Milch, geimpft mit frischem Sesamkuchen A.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	SM I	SM II	SM III
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	56 Stunden	10 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	explosionsartig gebläht, käsig geronnen	stark gebläht, käsig geronnen	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	säuerlich, stark bitter	säuerlich, stark bitter	fade säuerlich
Säuregrad	8,0 n/10 NaOH	10,8 n/10 NaOH	8,2 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	SM I		SM II		SM III	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus . . .	—	—	2	2	—	—
Bacillus megatherium . . .	2	7	20	22	—	—
Bacillus mycoides	3	10	—	—	—	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	1	—
Bacterium acidi lactici . . .	1	4	16	18	2	—
Bacterium aërogenes	1	4	—	—	—	—
Bacterium Güntheri	20	71	50	54	465	77
Gelber Gasbildner	—	—	3	3	135	23
Buttersäurebacillus, unbew. .	1	4	1	1	—	—
Weiße Streptothrix	—	—	—	—	1	—
Gesamtzahlen	28	100	92	100	604	100

Untersuchungsergebnisse: Viel spätere makroskopische Veränderung der mit steriler Milch angesetzten Proben als der analogen Konsummilchproben bei der Aufbewahrungstemperatur von 22° C und insbesondere von 12° C. Auffallend niedrige Keimzahlen gegenüber den korrespondierenden Konsummilchproben; vollständiges Verschwinden der im Impfmaterial nachgewiesenen Kokken, des Bacillus tumescens und des Bact. Zopfii, relativ gute Entwicklung des Bacillus megatherium in Probe SM I und SM II.

Serie 12.

Sterile Milch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 24 Std. bei 37° C war. (Vergl. Serie 1, Probe S I a p. 200.)

Untersuchungsresultate siehe folgende Seite.

Ergebnisse: Relativ niederer Säuregrad der Milch bei 22° und 12° C; ziemlich gleichmäßige Flora bei allen 3 Temperaturen; Hervortreten der Gasbildner; vor allem typische Ausbildung des Bacterium coli; verhältnismäßig bescheidene Entwicklung des Bacterium Güntheri, gänzliches Eliminieren des Bacterium fluorescens, des Bacillus mesentericus und der Kokken.

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	SM Ia	SM Ib	SM Ic
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	30 Stunden	6 Tage
Makroskopisches Aussehen	Blähung, käsig geronnen	Gas, feinflockig geronnen	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	schwach säuerlich	unrein säuerlich-talgig	säuerlich-bitter
Säuregrad	11,0 n/10 NaOH	9,3 n/10 NaOH	10,8 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	SM I a		SM I b		SM I c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium coli	100	8	60	5	400	13
Bacterium acidi lactici	400	33	80	6	900	30
Bacterium Güntheri	500	41	900	66	1400	47
Gelber Gasbildner	200	16	180	13	300	10
Gelber Säurebildner	20	2	140	10	—	—
Gesamtzahlen	1220	100	1360	100	3000	100

Ein Vergleich obiger Proben mit den analogen Konsummilchproben zeigt uns, daß die Zusammensetzung der Spaltpilzflora der geimpften Konsummilchproben ganz wesentlich von der „natürlichen" Stammflora dieser letzteren beeinflußt wird.

Serie 13.

Sterile Milch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 48 Stunden bei 37° C war. (Vergl. Serie 1, Probe S I b, p. 200.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S M II a	S M II b	S M II c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	30 Stunden	6 Tage
Makroskopisches Aussehen	etwas Gas, locker ziegerig geronnen	Blähung, käsig geronnen	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	unrein sauer	unrein säuerlich	säuerlich-bitter
Säuregrad	11,3 n/10 NaOH	10,1 n/10 NaOH	12,2 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M II a		S M II b		S M II c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium coli	200	11	190	18	45	3
Bacterium acidi lactici	150	8	70	6	80	6
Bacterium Güntheri	1300	69	800	73	1050	71
Gelber Gasbildner	200	11	30	3	300	20
Gelber Säurebildner	20	1	—	—	—	—
Gesamtzahlen	1870	100	1090	100	1475	100

Von den 9 im Impfmaterial vorhandenen Arten finden sich in vorstehenden Proben noch 4. Es hat also eine scharfe Auslese stattgefunden. Hervorzuheben ist auch hier die relativ starke Vertretung und die typische Ausbildung des Bacterium coli, sowie das vollständige Fehlen der Fluoreszenten.

Serie 14.

Sterile Milch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 5 Tage bei 37° C war. (Vergl. Serie 1, Probe S I c, p. 200.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S M III a	S M III b	S M III c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	48 Stunden	8 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	stark gebläht, käsig geronnen	feinflockig geronnen	grobflockig geronnen
Geschmack	fade säuerlich	widerlich süß	schwach säuerlich
Säuregrad	9,9 n/10 NaOH	8,4 n/10 NaOH	11,6 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M III a		S M III b		S M III c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	—	—	800	39
Bacterium putidum	—	—	—	—	200	9
Bacterium coli	—	—	7	1	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	200	23	300	20	200	9
Bacterium aërogenes	20	2	80	5	—	—
Bacterium Güntheri	500	56	900	61	900	43
Gelber Gasbildner	170	19	200	13	—	—
Gesamtzahlen	890	100	1487	100	2100	100

Bacillus mesentericus, der im Impfmaterial mit 82 Proz. vertreten war, ist gänzlich verschwunden. Dieser Sporenbildner scheint in steriler Milch überhaupt schwierig fortzukommen. — Die Produktion von Säure bei der Gärung ist in Serie 14 weit überwiegend. Die Fluoreszenten, die im Impfmaterial in kaum nachweisbarer Menge anwesend waren, nehmen nun bei 12° C in der geimpften Milch den ersten Rang ein.

Serie 15.

Sterile Milch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 24 Stunden bei 22° C war. (Vergl. Serie 2, Probe S II a, p. 201.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S M IV a	S M IV b	S M IV c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	2½ Tage	8½ Tage
Makroskopisches Aussehen . .	stark gebläht, locker käsig geronnen	feinflockig geronnen, schwach Gas	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	unrein, schwach säuerlich	fade säuerlich	säuerlich, stark bitter
Säuregrad	8,2 n/10 NaOH	10,0 n/10 NaOH	12,9 n/10 NaOH

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M IV a		S M IV b		S M IV c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	—	—	—	—	2	—
Bacterium fluorescens . . .	—	—	8	1	70	6
Bacterium coli	500	41	50	3	20	2
Bacterium acidi lactici . . .	200	17	100	5	90	7
Bacterium Güntheri	500	41	1580	81	490	40
Gelber Gasbildner	15	1	200	10	10	1
Gelber Säurebildner	—	—	—	—	530	44
Gesamtzahlen	1215	100	1938	100	1212	100

Ergebnisse: Von den 8 Arten des Impfmaterials sind 3 in der ursprünglich sterilen, dann aber geimpften Milch nicht mehr nachweisbar. Bei 37° C ist eine Milchsäuregärung eingetreten, bei der die Coli-acidi lactici-Gruppe die Hauptrolle spielt. Bacterium Güntheri wurde bedeutend zurückgedrängt, ist aber bei 22° C stark vertreten. Die Fluoreszierenden vermochten sich nur in bescheidener Menge zu halten. Bei 12° C hat sich der gelbe Gasbildner außergewöhnlich stark entwickelt.

Serie 16.

Sterile Milch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 48 Stunden bei 22° C war. (Vergl. Serie 2, Probe S II b, p. 201.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S M V a	S M V b	S M V c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	16 Stunden	42 Stunden	8 Tage
Makroskopisches Aussehen . .	stark gebläht, kompakt käsig geronnen	ganz feinflockig geronnen, Gas	sehr feinflockig geronnen
Geschmack	fade süßlich	säuerlich mit talgig-bitterem Nachgeschmack	intensiv sauer, stark bitter
Säuregrad	9,3 n/10 NaOH	9,2 n/10 NaOH	16,7 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M V a		S M V b		S M V c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	—	—	800	15	2200	65
Bacterium coli	100	16	—	—	—	—
Bacterium acidi lactici . . .	60	10	300	6	200	6
Bacterium aërogenes	20	3	200	4	80	2
Bacterium Güntheri	330	52	3500	67	900	27
Gelber Gasbildner	80	13	200	4	—	—
Gelber Säurebildner	40	6	200	4	—	—
Buttersäurebacillus, unbew. .	—	—	20	—	—	—
Gesamtzahlen	630	100	5220	100	3380	100

Von den im Impfmaterial vorhandenen Arten sind Bacillus mesentericus, die Kokken und das unbekannte Stäbchen (Faltenkolonie) nicht zur Entwicklung gekommen. Dagegen ist Bacterium fluorescens bei 22° und 12° C und **Bacterium aërogenes** bei allen 3 Temperaturen in vorstehender Serie neu aufgetreten. Die makroskopische Veränderung setzte bei 37° C gleichzeitig, bei 22° C 2 Stunden später und bei 12° C erst 3¼ Tage später ein als bei den analogen Konsummilchproben. Die frühere Veränderung der letzteren ist wohl durch die Eigenflora der Konsummilch bedingt.

Serie 17.

Sterile Milch, geimpft mit Sesamkuchen A, der angefeuchtet 5 Tage bei 22° C war. (Vergl. Serie 2, Probe S II c, p. 201.)

Makroskopische Vorprüfung.

Kurze Bezeichnung der Probe	S M VI a	S M VI b	S M VI c
Gärtemperatur	37° C	22° C	12° C
Gärdauer	18 Stunden	30 Stunden	17 Tage
Makroskopisches Aussehen	stark gebläht, käsig geronnen	Gasbildung, ganz feinflockig geronnen	grobflockig geronnen
Geschmack	schwach sauer	unangenehm widerlich-süßlich	faulig-bitter
Säuregrad	12,3 n/10 NaOH	8,0 n/10 NaOH	14,3 n/10 NaOH

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen in Millionen pro ccm).

Bakterienart	S M VI a		S M VI b		S M VI c	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
Bacterium fluorescens	—	—	5	—	1100	50
Bacterium putidum	—	—	—	—	300	14
Bacterium coli	300	19	20	1	—	—
Bacterium acidi lactici	300	19	300	19	100	4
Bacterium Güntheri	900	57	700	43	700	32
Gelber Gasbildner	40	3	500	31	—	—
Gelber Säurebildner	30	2	100	6	—	—
Gesamtzahlen	1570	100	1625	100	2200	100

Ergebnisse: Alle in die sterile Milch eingeimpften Arten, mit Ausnahme der Kokken, haben sich entwickelt, so daß die Pilzflora vorstehender Serie qualitativ ein ziemlich getreues Abbild von der des Impfmaterials ist. Quantitativ aber treten wesentliche Unterschiede zutage. Das **Bacterium Güntheri** nimmt bei 37 und 22° C, verglichen mit dem Vorkommen im Impfmaterial, einen höheren Prozentsatz der Gesamtflora ein, während der gelbe Gasbildner und der gelbe Säurebildner bei Probe S M VI b und S M VI a etwas zurückgegangen sind und in der Milch S M VI c sogar ganz ausgeschaltet wurden. Dagegen haben sich die gasbildenden Milchsäurebakterien bei 37°, wie bei 22° C, verhältnismäßig stark vermehrt.

Kurze Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse von Sesamkuchen A.

(Zusammenstellung siehe folgende Seite).

Bemerkungen zur Tabelle.

1. **Makroskopische Veränderung**: Früherer Eintritt der makroskopischen Veränderung der geimpften Konsummilch gegenüber den Kontrollmilchproben sowohl bei 37° C, als auch bei 22° und 12° C. — Geimpfte

Zusammenstellung.

No. der Serie	Art der Probe	Kurze Bezeichnung der Probe	Gärung		Säuregrad in n/10 NaOH	Gesamtkeimzahl pro g bzw. pro ccm in Millionen	Hauptvertreter der Bakterienflora in %									
			Temperatur in Celsius	Dauer			Bac. mesent. u.Bac.subtilis	Fluoreszent.	Gasb. Milchsäurebakt.			Bact. Günth.	Gelb. Gas- u. gelb. Säureb.	Kokken	Rest	Summe
									Bact. coli	B. acidi lactici	Bact. aërogen.					
	Sesamkuchen A	A	—	frisch	—	0,152	17	—	—	4	—	—	3	26	50	100
1	Probe A, angefeuchtet bei 37° C	S I a	37°	24 Std.	—	787	1	—	5	4	—	39	25	25	1	100
		S I b	37°	48 Std.	—	2260	17	3	3	1	—	67	3	4	2	100
		S I c	37°	5 Tage	—	4648	82	—	—	2	—	13	1	2	—	100
2	Probe A, angefeuchtet bei 22° C	S II a	22°	24 Std.	—	2010	15	25	—	+ 1)	—	5	25	5	25	100
		S II b	22°	48 Std.	—	2050	2	—	4	9	—	1	59	17	8	100
		S II c	22°	5 Tage	—	2670	—	3	4	3	—	34	52	4	—	100
3	Kontrollmilchproben	K a	37°	18 Std.	10,2	130	—	—	4	15	+ 1)	79	—	—	2	100
		K b	22°	42 Std.	13,0	1490	—	36	—	+	—	64	—	+	—	100
		K c	12°	4½ Tg.	10,8	874	—	42	—	1	—	46	—	11	—	100
4	Frische Milch + Probe A frisch	M I	37°	17 Std.	13,3	303	—	—	18	4	—	78	—	—	—	100
		M II	22°	30 Std.	10,2	856	—	24	+	+	—	70	—	5	1	100
		M III	12°	4¼ Tg.	13,6	6268	—	99	—	+	—	1	—	—	—	100
5	Frische Milch + Probe S I a	M I a	37°	16 Std.	9,6	1628	1	—	6	31	18	25	19	—	—	100
		M I b	22°	29 Std.	10,1	730	—	4	—	3	8	82	3	—	—	100
		M I c	12°	4½ Tg.	12,3	3500	—	77	—	6	—	17	—	—	—	100
6	Frische Milch + Probe S I b	M II a	37°	16 Std.	10,8	1310	—	—	4	3	—	92	1	—	—	100
		M II b	22°	28 Std.	12,2	4312	—	5	2	5	—	86	+	2	—	100
		M II c	12°	3¼ Tg.	14,1	2453	+ 1)	58	8	12	—	21	—	—	1	100
7	Frische Milch + Probe S I c	M III a	37°	17 Std.	12,4	1150	—	—	—	13	9	78	—	—	—	100
		M III b	22°	30 Std.	13,5	1327	+	9	—	7	15	68	1	—	—	100
		M III c	12°	4½ Tg.	13,5	4535	+	16	—	2	2	80	+	—	—	100
8	Frische Milch + Probe S II a	M IV a	37°	17 Std.	7,5	580	2	—	14	15	—	69	—	—	—	100
		M IV b	22°	30 Std.	12,0	1010	—	14	—	4	—	79	3	—	—	100
		M IV c	12°	4½ Tg.	13,7	1640	—	79	—	—	—	18	2	1	—	100
9	Frische Milch + Probe S II b	M V a	37°	16 Std.	8,9	920	2	—	3	26	14	44	11	—	—	100
		M V b	22°	40 Std.	12,5	4640	—	4	2	2	—	91	1	—	—	100
		M V c	12°	4¾ Tg.	11,9	3155	—	13	1	9	—	76	1	—	—	100
10	Frische Milch + Probe S II c	M VI a	37°	17 Std.	10,5	663	—	—	1	6	—	90	3	—	—	100
		M VI b	22°	30 Std.	12,5	545	—	2	5	24	—	44	25	—	—	100
		M VI c	12°	4 Tg.	14,1	2100	—	24	—	5	—	71	—	—	—	100
11	Sterile Milch + Probe A frisch	SM I	37°	18 Std.	8,0	28	—	—	—	4	4	71	—	—	21	100
		SM II	22°	56 Std.	10,8	92	2	—	—	18	—	54	3	—	23	100
		SM III	12°	10 Tg.	8,2	604	—	+	—	+	—	77	23	—	—	100
12	Sterile Milch + Probe S I a	SM I a	37°	16 Std.	11,0	1220	—	—	8	33	—	41	18	—	—	100
		SM I b	22°	30 Std.	9,3	1360	—	—	5	6	—	66	23	—	—	100
		SM I c	12°	6 Tg.	10,8	3000	—	—	13	30	—	47	10	—	—	100
13	Sterile Milch + Probe S I b	SM II a	37°	18 Std.	11,3	1870	—	—	11	8	—	69	12	—	—	100
		SM II b	22°	30 Std.	10,1	1090	—	—	18	6	—	73	3	—	—	100
		SM II c	12°	6 Tg.	12,2	1475	—	—	3	6	—	71	20	—	—	100
14	Sterile Milch + Probe S I c	SM III a	37°	18 Std.	9,9	890	—	—	—	23	2	56	19	—	—	100
		SM III b	22°	48 Std.	8,4	1487	—	—	1	20	5	61	13	—	—	100
		SM III c	12°	8 Tg.	11,6	2100	—	48	—	9	—	43	—	—	—	100
15	Sterile Milch + Probe S II a	SM IV a	37°	16 Std.	8,2	1215	—	—	41	17	—	41	1	—	—	100
		SM IV b	22°	2½ Tg.	10,0	1938	—	1	3	5	—	81	10	—	—	100
		SM IV c	12°	8½ Tg.	12,9	1212	+	6	2	7	—	40	45	—	—	100
16	Sterile Milch + Probe S II b	SM V a	37°	16 Std.	9,3	630	—	—	16	10	3	52	19	—	—	100
		SM V b	22°	42 Std.	9,2	5220	—	15	—	6	4	67	8	—	—	100
		SM V c	12°	8 Tg.	16,7	3380	—	65	—	6	2	27	—	—	—	100
17	Sterile Milch + Probe S II c	SM VI a	37°	18 Std.	12,3	1570	—	—	19	19	—	57	5	—	—	100
		SM VI b	22°	30 Std.	8,0	1625	—	+	1	19	—	43	37	—	—	100
		SM VI c	12°	17 Tg.	14,3	2200	—	64	—	4	—	32	—	—	—	100

1) + bedeutet: Anwesend, aber weniger als ½% der Gesamtflora ausmachend.

ursprünglich sterile Milch verändert sich im Durchschnitt langsamer als die analoge Konsummilch. Dies gilt vor allem bei der Aufbewahrung bei 12° C.

2. Säuregrad: Im Säuregrad der Milchproben ist bei einer Aufbewahrungstemperatur von 37° C kein deutlicher Unterschied wahrzunehmen. Bei 22° C jedoch ist der Säuregrad der geimpften Milchproben in der Regel kleiner als derjenige der ungeimpften Kontrollproben, bei 12° aber umgekehrt bedeutend größer. Die aus steriler Milch hergestellten Proben weisen im allgemeinen wesentlich niedere Säuregrade auf, als die analogen Konsummilchproben.

3. Gesamtkeimzahl: Die mit frischem oder gärendem Sesamkuchen A geimpfte Konsummilch ist unter gleichen Bedingungen bei allen 3 Temperaturen im Durchschnitt viel bakterienreicher, als die analogen Parallelproben der ursprünglich sterilen Milch. Bei einer Aufbewahrungstemperatur von 37° C macht sich die Einwirkung des Impfmaterials auf Zahl und Art der Bakterienflora am weitaus deutlichsten geltend. Bei 22° ist kein wesentlicher und durchgreifender Unterschied festzustellen; bei 12° C ist bald ein Einfluß wahrzunehmen, bald aber nicht.

4. Arten: Die weitaus häufigsten Arten sind sowohl in geimpfter Konsummilch als in geimpfter steriler Milch stets die Milchsäurebakterien. Die Gruppe der „Heu- und Kartoffelbazillen“, welche durch das Gärungsmaterial in ansehnlicher Zahl eingeimpft wurden, wird durch die Milchsäureproduzenten sowohl in der Konsummilch, als in der geimpften sterilen Milch durchgehends vollständig unterdrückt. Das gleiche ist bei den Kokken der Fall; in steriler Milch kommen letztere überhaupt nicht fort. Die Fluoreszenten entwickelten sich in den vorstehenden Versuchsreihen viel besser in Konsummilch als in steriler Milch. Bei 37° C treten sie überhaupt nirgends auf; bei 22° C kommen sie in der geimpften Konsummilch regelmäßig, in steriler Milch seltener vor; bei 12° C jedoch bilden sie stets einen Hauptbestandteil der Spaltpilzflora der Milch.

Der gelbe Gasbildner Holliger und der gelbe Säurebildner Levy zeigen in sterilisierter Milch bedeutend besseres Wachstum als in den Konsummilchproben. Ebenso entwickeln sich die gasbildenden Milchsäurebakterien bedeutend besser in sterilisierter Milch. Vor allem kommen hier das Bact. coli und das Bacterium aërogenes in typischer Ausbildung und größerer Menge vor. Umgekehrt verhält sich das Bacterium Güntheri, welches stets in der Konsummilch seine maximale Entwicklung, aber auch ein besser ausgebildetes Säureproduktionsvermögen aufweist.

Sowohl in geimpfter Konsummilch als auch in geimpfter steriler Milch findet konstant eine scharfe Auslese aus der Zahl der durch das Impfmaterial hineingebrachten Bakterienarten statt. In allen Fällen bilden bei 37° C und bei 22° C die Milchsäurebakterien den weitaus überwiegenden Bestandteil der Bakterienflora. Bei 12° C kommen hierzu regelmäßig noch die Fluoreszenten. — Im großen Durchschnitt hat sich auch in den Versuchen mit Sesamkuchen A die Erscheinung bestätigt, daß die natürliche Flora der Konsummilch alle, mit der bescheidenen Menge von $^1/_{100}$ g Impfmaterial auf 100 ccm Milch eingeimpften, dieser natürlichen Flora nicht nahestehenden Arten, leicht und sicher zu unterdrücken vermag, daß aber durch das Impfmaterial, namentlich dann, wenn die geimpften Milchproben bei 37° C oder bei 12° C aufbewahrt werden, in der Regel bedeutende Verschiebungen in der Vertretung der einzelnen Arten, innerhalb dieser Stammflora der Konsummilch, eintreten können.

7. Sesamkuchenprobe B.

Das Material wurde am 16. Juni 1910 durch gefl. Vermittlung von Herrn A. T. aus Neuenburg zugesandt. Aussehen normal, Geruch aromatisch, Farbe ziemlich hell, Kuchen von relativ weicher, krümeliger Konsistenz.

Kuchen B frisch.

28. Juni. Verarbeitung, wie üblich, auf Gelatine- und Agarplatten und hohe Schichtkultur.

Untersuchungsergebnis (Zahlen pro g).

Bakterienart	Keimzahl	
	absolut	%
Bacillus mesentericus.	200 000	15
Bacillus tumescens	100 000	7
Bacterium fluorescens	90 000	7
Bacterium acidi lactici	30 000	2
Bacterium Zopfii	20 000	2
Kleiner Coccus in rötlichen Kolonien	80 000	6
Großer Diplococcus in weißen Kolonien	30 000	2
Kleiner „ „ „ „	300 000	22
Gelber Säurebildner	100 000	7
Gelbe „Faltenkolonie“ mit Hirnstruktur	110 000	8
Bewegliche Sarcina	160 000	12
Weiße Streptothrix-Spezies	140 000	10
Gesamtzahl	1 360 000	100

Die Gesamtkeimzahl dieser Probe ist eine außerordentlich hohe. Sie wird von keiner einzigen Sesammehlprobe erreicht. Die Hauptflora bilden die Kokken, welche nicht weniger als 30 Proz. der Keimzahl beanspruchen. Stark vertreten ist auch Bacillus mesentericus und, als Kuriosum in der Futtermittelflora, eine sehr rasch bewegliche, fakultativ anaërobe Sarcina.

Sesamkuchen B, angefeuchtet in gärendem Zustande, bei Zimmertemperatur aufbewahrt und in Intervallen von 12 zu 12 Stunden untersucht.

Es wurden 12 Proben zu 40 g vom frischen Material in sterile Gläser abgewogen, mit 80 ccm sterilem Wasser zu einem dicken Brei verrührt und hierauf alle Proben zu Zimmertemperatur (18—20° C) gestellt. In Zwischenräumen von 12 Stunden wurde je eine Probe quantitativ und qualitativ untersucht. — Wir geben im folgenden der Kürze halber nur eine gedrängte Zusammenstellung der Untersuchungsresultate.

(S. die Tabellen auf p. 216.)

Erst nach 24—36 Stunden setzt eine makroskopisch bemerkbare Veränderung der angefeuchteten Proben ein. Sie äußert sich vorerst in einer schwachen, gelben Verfärbung des Materials, dann aber auch in einem immer deutlicher auftretenden säuerlichen Geruch. Nach und nach tritt auch Schimmelbildung auf, die Probe wird muffig und zeigt mehr oder weniger leicht wahrnehmbare Entwicklung von Ammoniak. Der Säuregrad hat zwischen dem vierten und fünften Tage der Gärung sein Maximum erreicht, fällt dann rasch um ein Bedeutendes und bewegt sich in der Folge um gewisse Mittelwerte.

Voruntersuchung.

Bezeichnung	Gärdauer	Makroskopisches Aussehen	Verarbeitete Menge g	Säuregrad n/10 NaOH
B 1	½ Tag	Probe noch beinahe unverändert, schwacher Geruch nach feuchtem Mehl	5,9445	6,5
B 2	1 „	Kaum merklich verändert, doch Anklang an säuerlichen Geruch	5,9443	9,5
B 3	1½ „	Aussehen noch normal, aber schon deutlich säuerlicher Geruch	5,9379	10,2
B 4	2 „	Masse schwach gelblich verfärbt, deutlich sauer riechend	5,9275	12,3
B 5	2½ „	Deutliche gelbe Verfärbung, säuerlicher Geruch, etwas muffig	5,9250	17,3
B 6	3 „	Verfärbung, ganz schwacher Schimmelanflug, schwache Ammoniakproduktion	5,9102	16,1
B 7	3½ „	Schimmelbildung etwas fortgeschritt., Geruch muffig-säuerlich, Ammoniakproduktion .	5,8961	18,4
B 8	4 „	Ganze Masse ockergelb verfärbt, mäßige Schimmelbildung, muffig	5,8821	21,1
B 9	4½ „	Ähnlich Probe 8, Oberflächenschicht klotzig verhärtet	5,8568	17,8
B 10	5 „	Zunehmende Schimmelwucherung, Oberfläche verhärtet, Ammoniakproduktion.	5,8476	14,5
B 11	5½ „	Wucherung eines gelben Pilzes auf der Oberfläche, Geruch muffig-faulig	5,8447	9,6
B 12	6 „	Üppige Schimmelbildung an der Oberfläche, Geruch stark sauer	5,8445	11,9

Mikroskopischer Befund.

Bezeichnung	Gesamtkeimzahl pro g lufttrockenes Sesammehl berechnet in Millionen	Die einzelnen Bakterienarten in Prozenten												
		Bacillus mesentericus	Bacterium fluorescens	Bacterium putidum	Gasbildende Milchsäurebakt.			Bact. Güntheri	Gelber Gasbildner	Gelber Säurebildner	„Faltenkolonie“	Kokken	Andere Arten
					Bact. coli	Bact. acidi lactici	Bact. aërog.						
B 1	0,749	16	—	—	1	—	—	—	27	—	27	11	18
B 2	27,293	2	1	+[1]	6	+	—	—	51	3	10	18	9
B 3	213,3	+[1]	1	+	23	+	—	3	48	1	9	14	1
B 4	2 020	—	16	2	16	+	—	10	41	7	—	—	8
B 5	3 233	—	15	10	7	1	+	39	11	15	—	—	2
B 6	13 928	—	9	25	+	5	—	31	5	22	—	—	3
B 7	10 270	—	11	17	1	+	+	60	—	4	—	—	7
B 8	15 170	—	14	11	5	4	1	62	—	+	—	—	3
B 9	14 195	—	10	16	26	2	2	24	4	15	—	—	1
B 10	10 080	—	28	22	12	—	2	25	+	7	—	—	4
B 11	15 880	—	21	34	15	—	3	11	—	11	—	—	5
B 12	14 120	—	14	48	7	—	16	2	—	15	—	—	—

Was den Keimgehalt betrifft, so ist eine ununterbrochene Zunahme bis zum Ende des dritten Tages der Gärung und von da an ein fortwährendes Schwanken innerhalb relativ bedeutenden Grenzen, bei beständig hohem Bakteriengehalt, wahrzunehmen. Im Verlaufe der ersten 12 Stunden der Gärung hat die Gesamtkeimzahl um 44,9 Proz. abgenommen; dann aber setzte eine lebhafte Vermehrung ein, die nach dem dritten Tage ihren Höhepunkt überschritten hat. Von da an findet bald eine Abnahme, bald eine Zunahme statt.

---

[1] + = Anwesend, aber weniger als ½ % der Gesamtkeimzahl ausmachend.

Die einzelnen Arten zeigen im Verlaufe der Gärung ein verschiedenes Verhalten: Schon nach 12 Stunden sind mehrere der im frischen Sesamkuchen nachgewiesenen Arten ausgeschaltet. Bacillus mesentericus hat sich stark entwickelt, verschwindet aber bald. Rasch ist auch der gelbe Gasbildner herangewachsen; er bleibt bis zum Schluß des zweiten Tages die herrschende Art. Der gelbe Säurebildner setzt erst allmählich und bedeutend später mit der Vermehrung ein, bleibt jedoch bis zum Schlusse des Versuches nachweisbar. Ähnlich verhält sich das Bact. Güntheri; es gelangt aber zu viel größerer Bedeutung. Jedoch hat das Säuerungsvermögen infolge des langen Aufenthaltes unter ungünstigen Verhältnissen stark gelitten. Bei manchen Keimen ist es sogar gänzlich verloren gegangen, bei andern vermag sich die Eigenschaft nach und nach wieder zu regenerieren, so daß sterile Milch, die von den ersten Generationen nach 48 Stunden bei 37° C nicht dick gelegt worden war, nun schon nach 46 Stunden deutliche Gerinnung zeigte. —

Die gasbildenden Milchsäurebakterien sind stets vertreten. Bacterium aërogenes stellt sich erst gegen Schluß der Versuchsperiode ein, während das Bacterium coli die größte Bedeutung innerhalb der Gruppe einnimmt. Eine wichtige Rolle fällt den Fluoreszenten zu. Ursprünglich im Material nur in bescheidener Zahl vorhanden, scheinen sie im angefeuchteten Sesamkuchen vorerst eine Anpassungsperiode durchmachen zu müssen. Dann aber folgt eine zwar nur mäßig schnelle, aber bis annähernd zum Schlusse der Versuchszeit andauernde Vermehrung. Dabei macht sich mit aller Deutlichkeit die Tendenz geltend, daß das Peptonisierungsvermögen des Bacterium fluorescens liquefaciens L. et N. abnimmt, in manchen Fällen sogar ganz verloren geht. Es findet ziemlich häufig ein sprungweiser Übergang in das Bacterium putidum statt.

In mancher Beziehung stimmen die Untersuchungsergebnisse vorstehender Probe mit jenen von Sesammehl überein.

8. Sesamkuchenproben C—L.

a) Sesamkuchen C und D.

Probe C stammt aus Yverdon, Kt. Waadt, und ging durch Herrn A. T. am 30. November 1909 ein. Die Probe war sehr hart und die Schnittfläche zeigte eine hornartige, glatte Beschaffenheit; die Farbe des Kuchens war hellgrau.

Probe D ging am 29. Januar 1910 von einer landwirtschaftlichen Genossenschaft der Zentralschweiz durch Vermittlung von Herrn A. St. aus S. ein. Aussehen normal, Farbe hellgrau, Geruch frisch, stark aromatisch, der Kuchen hatte krümelige, nicht hornartige Schnittfläche und war ziemlich weich. — Anlegen der Kulturen wie üblich.

Mikroskopischer Befund siehe folgende Seite.

Untersuchungsergebnisse: Großer Unterschied im Keimgehalt beider Proben sowohl quantitativ als qualitativ: Bei Probe C ließen sich 14, bei Probe D 13 Arten nachweisen. Von diesen sind aber nur 6 beiden Sesamkuchen gemeinsam. Während bei Sesamkuchen C der Bacillus mesentericus ein auffälliges Übergewicht aufweist, tritt bei D ein im Säureproduktionsvermögen stark abgeschwächtes Bacterium Güntheri in sehr ansehnlicher Zahl auf. Daneben sind ein unbekanntes, relativ schlankes Kurzstäbchen und verschiedene Kokken als Hauptarten vertreten. Bei Probe D verdient noch speziell hervorgehoben zu werden, daß die letztgenannten 3 Arten nur in der hohen Schichtkultur vorhanden waren, ein weiterer Beweis dafür, daß sich in der Regel bei bakteriologischen Untersuchungen eine Kombination von Plattenkulturen und hoher Schicht als notwendig erweist.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesamkuchen C			Sesamkuchen D		
Bakterienart	Zahl absolut	%	Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacterium fluorescens . . .	2 000	1	Bacillus megatherium . . .	10 000	1
Bacillus mesentericus. . . .	250 000	68	Bacillus mesentericus. . . .	20 000	1
Bacillus subtilis	20 000	6	Bacterium Zopfii	20 000	1
Bacillus oxalaticus	10 000	2	Bacterium coli	25 000	2
Bacillus tumescens	20 000	6	Bacterium acidi lactici . . .	35 000	2
Weiße Streptothrix-Spezies .	11 000	3	Bacterium Güntheri	500 000	36
Bacterium Zopfii	10 000	2	Brockenkolonie, weiß. . . .	40 000	3
Bacterium acidi lactici . . .	4 000	1	Kurzstäbchen mit großem Abstand zwisch. d. Zellen, weiß	10 000	1
Gelber Gasbildner	8 000	2			
Unbek., unbew. Kurzstäbch..	6 000	2	Coli-ähnl. Kurzstbch. mit roten Kolonien	16 000	1
Brockenkolonie, goldgelb . .	7 000	2			
Kurzstäbch., unbew., rötliche Kolonien	2 000	1	Weiße Streptothrix-Spezies .	10 000	1
			Gelber Gasbildner	20 000	1
Diplococcus	9 000	2	Kokken	300 000	21
Bacillus putrificus coli . . .	7 000	2	Kurzstbch., unbew., schlank .	400 000	29
Gesamtzahl	366 000	100	Gesamtzahl	1 406 000	100

b) Sesamkuchen E und F.

Probe E: Eingang am 16. Februar 1910 aus Moudon (Kt. Waadt) von Herrn E. Ch., Farbe dunkelgrau bis bräunlich, Geruch schwach ranzig, Konsistenz mittelhart, zähe.

Probe F. Eingang am 1. Februar 1910 durch Herrn H. K., Verwalter, Thun (Kt. Bern). Aussehen des Kuchens normal, Probe aber sehr hart mit hornartiger, glänzender Schnittfläche.

Untersuchungsresultate (Zahlen pro g).

Sesamkuchen E			Sesamkuchen F		
Bakterienart	Zahl	%	Bakterienart	Zahl	%
Bacillus mesentericus. . . .	20 000	24	Bacillus mesentericus. . . .	100 000	38
Bacillus subtilis	7 000	8	Bacillus subtilis	30 000	12
Bacterium acidi lactici . . .	10 000	12	Bacillus megatherium . . .	10 000	4
Gelber Gasbildner	10 000	12	Bacillus tumescens	20 000	8
Faltenkolonie, gelb.	14 000	17	Bacillus oxalaticus	3 000	1
Diplococcus, gelbe Kolonien	7 000	8	Gelber Gasbildner	6 000	2
„ rote „	5 000	6	Buttersäurebazillen, unbew. .	4 000	1
Streptothrix, weiß	4 000	5	Sporenloses Kurzstäbchen .	80 000	31
Unbek., versch. Kurzstäbchen	7 000	8	Bact. acidi lactici	8 000	3
Gesamtzahl	84 000	100	Gesamtzahl	261 000	100

Bemerkungen: Die Probe E ist die keimärmste aller bisher untersuchten Sesamkuchenproben. Es wurden nur 84 000 Keime pro Gramm ermittelt, während bei Probe F deren 261 000 nachgewiesen werden konnten. In beiden untersuchten Sesamkuchen hat bei einer Zahl von 9 verschiedenen Arten die

Mesentericus-subtilis-Gruppe die wichtigste Rolle inne, da sie mit 32 Proz., bzw. mit 50 Proz. vertreten ist. Die Gasbildner sind in verhältnismäßig bescheidener Zahl vorhanden.

c) Sesamkuchen G und H.

Probe G wurde direkt von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Eingang am 7. Februar 1910. Makroskopisches Aussehen der Ware ausgezeichnet, ganz frisch, von aromatischem Geruch, hellgrau, Kuchen relativ weich, krümelig, Schnittfläche mehlig-pulverig.

Probe H: Zusendung von der Futtermittelhandlung B. in B., Kt. Bern, durch Vermittlung von Herrn Dr. J. K. Farbe nußbraun, dunkel; Aussehen normal.

Mikroskopische Untersuchung (Keimzahlen pro g).

Sesamkuchen G		
Bakterienart	Zahl	%
Bacillus mesentericus	40 000	34
Bacillus subtilis	1 000	1
Bacterium fluorescens	8 000	7
Bacterium putidum	4 000	3
Bacterium Zopfii	2 000	2
Bacterium acidi lactici	5 000	4
Gelber Gasbildner	10 000	8
Brockenkolonie	9 000	8
Bacterium herbicola aureum	1 000	1
Weiße Streptothrix	2 000	2
Bewegliche Sarcina	30 000	25
Unbew. Kurzstäbchen, karminrot	3 000	3
Kleiner Diplococcus, rötlich	2 000	2
Gesamtzahl	117 000	100

Sesamkuchen H		
Bakterienart	Zahl	%
Bacillus mesentericus	80 000	10
Bacillus mycoides	3 000	—
Bacterium fluorescens	2 000	—
Bacterium putidum	3 000	—
Bacterium coli	3 000	—
Bacterium acidi lactici	20 000	3
Gelber Gasbildner	3 000	—
Langstäbchen, unbekannt	550 000	71
Streptothrix chromogena	20 000	3
„ alba	30 000	4
Diplococcus, groß	40 000	5
Buttersäurebazillen, unbew.	5 000	1
Bacillus putrificus coli	20 000	3
Gesamtzahl	779 000	100

Sesamkuchen G ist verhältnismäßig keimarm; in der Zahl vorherrschend ist wieder **Bacillus mesentericus**. Als Kuriosität kommt hier eine sehr rasch bewegliche **Sarcina** hinzu. Dieselbe wächst nur in hoher Schicht, und es werden anaërobe Lebensbedingungen vorgezogen. Die erste Generation, direkt aus dem Sesamkuchen isoliert, zeigte besondere Vorliebe zu obligat anaërobem Wachstum, indem in dicht besetzter hoher Schichtkultur bis ca. ½ cm unterhalb der Oberfläche nach oben nur sehr schwache Entwicklung erfolgte. Die Kolonien in der Tiefe erreichten in schwach besetztem Nährboden einen Durchmesser von ca. ½—1 mm; die Art gelangt in ihren Kolonien also zu recht ansehnlicher Größe. Bei fortgesetzter, sorgfältiger Überimpfung von streng anaërob gewachsenen Kolonien in Milchzuckeragar hohe Schichtkultur, tritt das fakultativ anaerobe Wachstum mehr hervor. — Diese bewegliche **Sarcina** konnte auch aus verschiedenen anderen Proben isoliert werden.

In Sesamkuchen H fällt ein in großer Menge aufgetretenes, sporenloses Stäbchen besonders auf. Dieser, auch in der Probe F aufgetretene Organismus, wächst in grauen, coli-ähnlichen Kolonien von 2—4 mm Durchmesser. Die Kolonien sind in der Mitte etwas erhaben, zeigen eine deutliche Aderung und in der Farbe einen schwachen Anklang an Silberglanz. Gas- und Säurebildung fehlen. Nach Prof. Düggeli[1]) wird dieses in der zugänglichen Literatur noch nicht beschriebene Bakterium öfters auch in wenig oder nie gedüngter Erde angetroffen.

---

[1]) Mündliche Mitteilung.

d) Sesamkuchen I, K und L.

Probe I stammt aus einer Futtermittelhandlung in Yverdon, Kt. Waadt, Zusendung durch Vermittlung von Herrn A. T. Aussehen normal, Farbe hellbraun, Konsistenz: Mittelhart und zähe.

Probe K wurde direkt von einer deutschen Großfirma aus M. bezogen. Makroskopisches Aussehen sehr schön und frisch. Geruch aromatisch, Kuchen verhältnismäßig weich und krümelig.

Probe L: Herkunft wie Probe I. Farbe dunkelbraun, Kuchen von sehr harter, zäher Konsistenz; Schnittfläche ganz glatt, hornartig, schwärzlich. — Verarbeitung: Überall wie üblich.

Mikroskopischer Befund (Keimzahlen pro g).

Sesamkuchen I			Sesamkuchen K		
Bakterienart	Zahl absolut	%	Bakterienart	Zahl absolut	%
Bacillus mesentericus. . . .	7 000	34	Bacillus mesentericus. . . .	5 000	1
Bacterium Zopfii	3 000	14	Bacillus subtilis	15 000	4
Bacillus tumescens	2 000	10	Bacillus tumescens	20 000	5
Bacterium acidi lactici . . .	1 000	5	Gelber Gasbildner	250 000	62
Gelber Gasbildner	2 000	10	Gelber Säurebildner	30 000	7
Streptothrix, weiß	2 000	10	Bacterium coli	1 000	—
Coccus, klein	1 000	5	Bacterium acidi lactici . . .	9 000	2
Unbekanntes Kurzstäbchen .	1 000	5	Bacterium Güntheri	20 000	5
Buttersäurebacillus, unbew. .	400	2	Streptothrix, weiß	3 000	1
Typische Sarcina	1 000	5	Große Kokken, weiße Kol. .	3 000	1
Gesamtzahl	20 400	100	Bewegliche Sarcina	50 000	12
			Gesamtzahl	406 000	100

Sesamkuchen L

Bacillus mesentericus	26 000	=	69 %
Bacillus subtilis	5 000	=	13 %
Bacillus tumescens	2 000	=	5 %
Bacterium Zopfii	1 000	=	3 %
Gelber Gasbildner.	500	=	1 %
„Brockenkolonie“, goldgelb . . .	500	=	1 %
Streptothrix, weiß	1 000	=	3 %
Gelber Diplococcus	1 000	=	3 %
Bacillus putrificus coli	700	=	2 %
Gesamtzahl	37 700	=	100 %

Die Proben I und L zeichnen sich durch einen auffallend geringen Bakteriengehalt aus, während Probe K, die direkt ab Fabrik bezogen wurde und ganz frisch und tadellos aussah, einen rund 11- bzw. 20-mal höheren Keimgehalt aufweist. Dieser Umstand kann in seiner Ursache zum Teil wohl dahin gedeutet werden, daß das Untersuchungsmaterial im Verlaufe der Zeit infolge immer stärkeren Austrocknens ganz ansehnlich an keimfähigen Spaltpilzen einbüßte. Vor allem werden die Nichtsporenbildner zurückgehen, und die Folge davon ist, daß die Sporenbildner im Sesamkuchen, also hauptsächlich die Angehörigen der Mesentericus-subtilis-Gruppe, dann verhältnismäßig stärker hervortreten. Für diese Annahme würde auch der Vergleich des relativen Gehaltes an Bacillus mesentericus und subtilis in vorstehenden

3 Proben sprechen. In Probe I beansprucht diese Gruppe der sog. Heu- und Kartoffelbazillen, die sich in ihren Dauerstadien als sehr resistent, sowohl gegen Wasserentzug als gegen hohe Temperaturen erweist, 34 Proz. des Keimgehaltes, in Probe L sogar 82 Proz., während in der ganz frischen Probe K nur 5 Proz. des gesamten Bakteriengehaltes der genannten Kategorie angehören.

Die bewegliche Sarcina, die sich schon in Probe G vorfand, kam auch in Probe K in ganz ansehnlicher Zahl vor.

Zusammenstellung der in den untersuchten frischen Sesamkuchen nachgewiesenen Hauptgruppen von Bakterien.

Bezeichnung	Gesamte Bakterienzahl pro g	Zahl der Arten	Vertretung der einzelnen Gruppen in %								Wichtigste Arten dieses Restes
			B. mesenteric. u. B. subtilis	Fluoreszent.	Milchsäurebakterien	Gelb. Gas- u. gelb. Säureb.	Kokken	Streptotrichaeen	Rest		
A	152 000	12	17	—	4	3	26	26	24	B. tumescens u. B. Zopfii je	7 %
B	1 360 000	12	15	7	2	7	30	10	27	Bewegl. Sarcina . .	12 %
C	366 000	14	74	1	1	2	2	3	17	Bac. putrificus coli	2 %
D	1 406 000	13	1	—	40	1	21	1	36	Schlank. Erdbakt. .	29 %
E	84 000	9	32	—	12	12	14	5	25	„Faltenkol.“, gelb .	17 %
F	261 000	9	50	+[1]	3	2	—	—	45	Schlankes Erdbakt.	31 %
G	117 000	13	35	10	4	8	2	2	39	Bewegl. Sarcina . .	25 %
H	779 000	13	10	+	3	+	5	7	75	Schlank. Erdbakt. .	71 %
I	20 400	10	34	—	5	10	5	10	36	Bac. tumescens 10%, B. Zopfii	14 %
K	406 000	11	5	—	7	69	1	1	17	Bewegl. Sarcina . .	12 %
L	37 700	9	82	—	—	1	3	3	11	Bac. putrificus coli	2 %
Mittel	453 554	11,4	32,3	1,8	7,4	10,4	9,9	6,2	32		

Wie aus vorstehender Zusammenstellung ersichtlich ist, können nach unsern Versuchen folgende Bakterienarten als für Sesamkuchen charakteristisch bezeichnet werden:

Die Gruppe von Bacillus mesentericus und B. subtilis. Die Vertreter dieser Kategorie von Spaltpilzen waren in allen untersuchten Proben in größerer oder kleinerer Zahl nachweisbar. Im Durchschnitt enthielten die 11 untersuchten Kuchen 32,3 Proz. dieser Spaltpilze (im Minimum 1 Proz., im Maximum 82 Proz.). Auf Bacillus subtilis entfällt davon aber nur ein ganz bescheidener Bruchteil. Es kann somit Bacillus mesentericus als typischer Bestandteil der Bakterienflora des Sesamkuchens bezeichnet werden.

Außerdem kommen im Sesamkuchen mit ziemlicher Regelmäßigkeit zwei, dem Bacterium coli mehr oder weniger verwandte Arten vor. Eine derselben wurde von Holliger als „gelber Gasbildner“ bezeichnet und beschrieben und von Lehmann und Levy Bacterium coli var. luteoliquefaciens benannt. Die andere Art wurde von Levy als gelber Säurebildner bezeichnet. Sie ist der erstgenannten ganz nahestehend, unterscheidet sich in ausgeprägter Eigenschaft in der Hauptsache durch ein etwas früheres Eintreten der Gelatineverflüssigung, schwache Säureproduktion und gänzliches Fehlen der Gasbildung. Unsere Beobachtungen bestätigen die Ansicht von **Lehmann** u. **Neumann**, daß eine scharfe Trennung beider Mikroorganismen praktisch kaum durchführbar ist, weil sie durch zahlreiche Übergänge miteinander verbunden sind und außerdem auch mit der Coli-Gruppe in bestimmter Beziehung stehen.

---

[1] + bedeutet: Vorhanden, aber prozentual nicht faßbar.

Ebenso regelmäßig wie der gelbe Gasbildner und der gelbe Säurebildner sind im Sesamkuchen Kokken verschiedener Art nachweisbar. Nur ein einziges Mal fehlten sie ganz.

Quantitativ folgen nun in der Vertretung verschiedene Arten von Milchsäurebakterien und die Streptotrichaeen.

Die Fluoreszenten sind im Sesamkuchen meistens nur zufällig und selten in bedeutender Zahl vorhanden.

Ein Vergleich der Untersuchungsergebnisse der Sesamkuchen mit jenen der Sesammehle führt in Übereinstimmung mit Burri[1]) und im Gegensatz zu der noch ziemlich verbreiteten Anschauung zum Schlusse, daß die Kuchen im allgemeinen nicht wesentlich bakterienärmer sind, als die Mehle. Zwar haben wir mehrere Sesamkuchenproben untersucht, welche durch einen sehr geringen Keimgehalt auffallen. So enthielt Probe E nur 84 000, Probe L nur 37 700 und Probe I sogar nur 20 400 Keime pro Gramm, während der geringste Bakteriengehalt bei Sesammehlen 116 000 pro Gramm betrug. — Im Gegensatz zu diesen Resultaten aber kommen die maximalen Keimzahlen der Sesamkraftfuttermittel auch wieder bei Kuchen vor. Doch weisen die Sesammehle nach unseren Untersuchungen im Durchschnitt eine komplizierter zusammengesetzte Spaltpilzflora auf, als die Sesamkuchen; denn im Mittel enthielten diese nur 11, jene aber 16 Bakterienarten pro untersuchte Probe.

Streptotrichaeen kommen in Sesammehlen viel seltener vor als in den Kuchen, dagegen gelangen in erstern die fluoreszierenden Arten unter den Spaltpilzen entschieden mehr zur Geltung.

9. Zusammenfassung der wichtigsten Resultate aus der Sesamuntersuchung.

Um Wiederholungen zu vermeiden, sei hier auf das anläßlich der Besprechung der einzelnen Sesammehl- und Kuchenproben Gesagte hingewiesen.

IV. Schlußsätze.

Unter Hinweis auf die am Ende der einzelnen Abschnitte gemachten Besprechungen, welche die Gesamtergebnisse vorliegender Arbeit in sich schließen, seien hier nur die wichtigsten Punkte zusammenhängend in Form von Schlußsätzen nochmals hervorgehoben.

I. Betreffend die Untersuchungstechnik.

a) Für die bakteriologische Untersuchung von frischer Kleie eignen sich als Plattenkulturen zuckerfreie Nährböden besser als zuckerhaltige. Bei Erdnuß- und Sesamuntersuchungen aber hat an Stelle des gewöhnlichen Nähragars Milchzuckeragar zu treten. Für gärende Kraftfuttermittel dagegen sind zuckerhaltige Nährböden entschieden vorzuziehen. Die Ursache dieser Erscheinung liegt in der qualitativ verschieden zusammengesetzten Mikroflora des Untersuchungsmaterials.

---

[1]) Vorlesung: Bakteriologie für Landwirte.

b) Zur Erlangung eines zuverlässigen und tunlichst vollständigen Untersuchungsergebnisses bei der bakteriologischen Prüfung von Kleie, Erdnuß- und Sesamkuchen und -mehlen genügt das Anlegen und die Untersuchung von Plattenkulturen nicht. Es hat sich vielmehr eine entsprechende Kombination von Gelatine- und Agarplattenkulturen mit hoher Schichtkultur, die mittels zuckerhaltigem Agar anzulegen ist, als notwendig und zweckmäßig erwiesen.

II. Betreffend die Bakterienflora der frischen, zur Untersuchung gelangten Kraftfuttermittel im allgemeinen.

a) In quantitativer Hinsicht:

1. Die in frischer Kleie und in frischen Erdnuß- und Sesamkuchen und -mehlen von normaler Beschaffenheit mittels der gewöhnlichen, kombinierten Kulturverfahren nachweisbare Bakterienzahl ist eine unerwartet große. Sie beträgt pro Gramm trockenen Materials:

Für Kleie im Durchschnitt von 15 untersuchten Proben: Im Mittel 5 970 000, im Maximum 14 900 000, im Minimum 92 000 Keime; für Erdnußmehle und -kuchen im Durchschnitt von 18 Proben im Mittel 1 237 800, im Maximum 3 343 000, im Minimum 262 000 Bakterien. Für Sesammehle und -kuchen beträgt die Zahl im Durchschnitt von 24 zur Untersuchung gelangten Proben: Im Mittel 471 970, im Maximum 1 406 000, im Minimum 20 400 Mikroorganismen.

2. Kleie ist durchschnittlich das keimreichste, Sesam das keimärmste der drei untersuchten Futtermittel. Erdnußkuchen und -mehle sind bedeutend reicher an Bakterien als Sesamkuchen und -mehle.

3. Feine Kleie ist nach unseren Versuchen um 57,5 Proz. keimreicher als grobflockiges Material. Dagegen sind die Sesammehle im Durchschnitt nicht wesentlich reicher an Spaltpilzen als die bezüglichen Kuchen. Die Erdnußkuchen erwiesen sich im allgemeinen ganz bedeutend bakterienreicher als die Erdnußmehle.

4. Die Schwankungen im Keimgehalt der einzelnen frischen Proben sind bei der Kleie verhältnismäßig am größten, bei Sesamfuttermitteln am relativ kleinsten.

b) In qualitativer Beziehung:

1. Die Bakterienflora von frischen Sesam- und Erdnußmehlen und -kuchen ist in der Hauptsache eine ähnlich zusammengesetzte. Sie ist jedoch eine viel kompliziertere als jene der Kleie. Es wurden im ganzen isoliert: Aus Kleie 21, aus Erdnußmehlen und -kuchen 44, aus Sesammehlen und -kuchen 48 verschiedene Spezies von Mikroorganismen. Die Mikroflora mancher Proben der zwei letztgenannten Futtermittel erscheint als eigentliches Sammelsurium von verschiedenen Bakterienarten.

2. In Kleie: Im Durchschnitt aller durchgeführten Versuche kommen pro Probe frischen Materials 6—7 (genau 6,8) Arten vor. In bezug auf Artenreichtum besteht zwischen grobflockiger und feinflockiger Kleie kein namhafter Unterschied.

Die vier in normaler, frischer Kleie am häufigsten auftretenden Bakterienarten sind:

Gelber Säurebildner Levy[1]),

Gelber Gasbildner Holliger = Bacterium coli var. luteoliquefaciens Lehmann et Levy,

---

[1]) Noch nicht lateinisch benannt.

Bacterium herbicola aureum Burri et Düggeli,

Bacterium fluorescens liquefaciens (Flügge) L. et N.

Außer diesen vier Arten, die den Hauptbestandteil der typischen Kleieflora bilden, kommen auch Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien häufig vor. Mehr oder weniger unregelmäßig konnten nachgewiesen werden: Bacillus mesentericus vulgatus Flügge, Bacillus megatherium De Bary und Bacillus tumescens Zopf. Kokken fanden sich in sieben Kleieproben, oder in 46,6 Proz. der Fälle vor. Die übrigen vorkommenden Spaltpilzarten können mehr als gelegentliche Bewohner der Kleie betrachtet werden.

3. Erdnußmehle und -kuchen. Von den im ganzen nachgewiesenen 44 Arten entfallen im Durchschnitt auf eine untersuchte Probe 13 Spezies von Mikroorganismen. Die Erdnußmehle sind im allgemeinen etwas artenreicher als die Erdnußkuchen.

Als für frische Erdnußfuttermittel charakteristische Bakterienarten sind nach den Ergebnissen unserer Versuche zu betrachten:

Bacillus mesentericus vulgatus Flügge,

Bacillus subtilis Cohn,

Gelber Gasbildner Holliger (= Bacterium coli var. luteoliquefaciens Lehmann et Levy),

Gelber Säurebildner Levy,

Gasbildende Milchsäurebakterien (Bacterium coli commune Escherich, Bacterium acidi lactici Hüppe und Bacterium lactis aërogenes Escherich).

Mehr für Erdnußmehle als für Erdnußkuchen charakteristisch sind ferner zwei Arten von Streptotrichaeen. [Streptothrix chromogena Gasperini (= Actinomyces chromogenes Gasperini) und Streptothrix alba Rossi-Doria (= Actinomyces chromogenes Gasperini β alba L. et N.).]

In bescheidener Zahl, aber doch mit ziemlicher Regelmäßigkeit, treten ferner Fluoreszenten (3,0 Proz. der Gesamtkeimzahl) und verschiedene Kokkenarten (8,6 Proz. der Gesamtkeimzahl) auf.

4. Sesammehle und -kuchen.

Im Durchschnitt aller vorgenommenen Untersuchungen enthält je eine Probe des frischen Materials 13—14 (genau 13,6) Spaltpilzarten. Die Sesammehle sind im allgemeinen artenreicher als die Sesamkuchen (Verhältnis 15,5 : 11,3). Die in Sesamfuttermitteln am häufigsten auftretenden Arten sind:

Bacillus mesentericus vulgatus Flügge,

Bacillus subtilis Cohn,

Gelber Gasbildner Holliger (= B. coli var. luteoliquefaciens Lehmann et Levy),

Gelber Säurebildner Levy,

Gasbildende Milchsäurebakterien,

Verschiedene Kokkenarten.

Die Fluoreszenten sind in den Sesamkuchen und -mehlen weniger regelmäßig nachweisbar, als in Erdnußfuttermitteln. In Sesammehlen und -kuchen nimmt auch die Mesentericus-subtilis-Gruppe auf Kosten des gelben Gas- und des gelben Säurebildners stark überhand. — Während die Streptotrichaeen bei den Erdnußfuttermitteln viel häufiger in Mehlen nachgewiesen werden können als in Kuchen, finden sie sich bei Sesam weit öfter in Kuchen als in Mehlen.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Bacillus putrificus coli Bienstock findet sich in Kleie selten, in Sesammehlen und -kuchen ziemlich oft, in Erdnußmehlen und -kuchen am häufigsten. — Ein in goldgelben, schollenartigen, kompakten Kolonien von 1—2 mm Durchmesser wachsendes, unbewegliches, sporenloses Stäbchen von 2—4 × 0,9—1,1 μ, ein **Bacterium**, das in der Literatur noch nicht beschrieben ist, scheint für frisches und namentlich für kurze Zeit bei spärlichem Wasserzusatz in Gärung übergegangenes Sesammehl bei einigen Proben charakteristisch zu sein. — Bemerkenswert ist endlich auch das Vorkommen einer rasch beweglichen **Sarcina**.

III. Betreffend die Bakterienflora in angefeuchteten, gärenden Kraftfuttermitteln.

1. In quantitativer Hinsicht.

Die Zahl der Bakterien nimmt in angefeuchteten Kraftfuttermitteln sowohl bei 22 als 37° C äußerst rasch zu; in allen Fällen macht sich im Anfangsstadium der Gärung deutliche Gasbildung bemerkbar.

Bei 37° C setzt die Gärung sehr energisch ein, hat aber in der Regel schon nach 1—2 Tagen ihren Höhepunkt erreicht. Von da an geht die Bakterienzahl wieder ziemlich rasch zurück. Bei einer Gärtemperatur von 22° C dagegen ist der maximale Gehalt an Spaltpilzen erst nach 2—4 Tagen vorhanden. Die Gärung verläuft bei dieser Temperatur überhaupt viel langsamer und ruhiger.

2. In qualitativer Beziehung.

Im ersten Stadium der Gärung sind die Abweichungen im Artenbestand des frischen und gärenden Materials meistens noch sehr geringe. Jedoch gelangen beinahe nie alle im frischen Futtermittel vorhandenen Arten zur Vermehrung. Es findet vielmehr fast ausnahmslos eine Reduktion der Artenzahl statt.

Mit fortschreitender Gärung unterliegt die Bakterienflora mehr und mehr einer Veränderung und zwar zunächst fast regelmäßig im Sinne einer überwiegenden Überhandnahme von Gas- und Säurebildnern. Die Gasbildung macht sich namentlich bei 37° C vielfach schon makroskopisch wahrnehmbar durch deutliche Blähung des befeuchteten Materials. — Auch im späteren Verlaufe der Gärung geht ein ständiger Wechsel, nicht nur in bezug auf das gegenseitige quantitative Verhältnis der einzelnen Spaltpilzarten, sondern vor allem auch in bezug auf die Verschiebung des Artenbestandes, vor sich. Der Gärungsvorgang in angefeuchteten Kraftfuttermitteln kann daher als ein metabiotischer Prozeß angesprochen werden.

In den angefeuchteten und in Gärung belassenen drei hier in Frage stehenden Futtermitteln gewinnen in der Regel zuerst die Vertreter aus der Gruppe der Milchsäurebakterien das entscheidende Übergewicht. Die Umsetzungen laufen in den ersten 3—4 Tagen meistens auf eine ausgesprochene Milchsäuregärung hinaus; später greift ein mehr gemischter Prozeß Platz. — Am ausgeprägtesten hat sich diese Milchsäuregärung in unseren Versuchen bei den Erdnußmehlen und -kuchen gezeigt. Bei gärender Kleie gewannen nicht selten gleich anfangs der gelbe Gasbildner Holliger, die Fluoreszenten und **Bacillus mesentericus vulgatus** Flügge wesentlich an Bedeutung.

Angefeuchtete Sesammehle und -kuchen sind nach unseren Versuchen im Durchschnitt für die Entwicklung der Milchsäurebakterien nicht so günstige Nährböden, wie die Erdnußfuttermittel.

Nicht nur die Gärdauer und die Aufbewahrungstemperatur, sondern vor

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

allem auch die Menge des Wasserzusatzes zum Sesammehl haben auf die Entwicklung der Bakterienflora in qualitativer und quantitativer Hinsicht einen sehr großen Einfluß.

Wie durch unsere Versuche dargetan wurde, ist das Bakterienwachstum bei 30° C im angefeuchteten Sesammehl C unter sonst gleichen Bedingungen quantitativ wie qualitativ ein viel reichlicheres als bei 20° C.

IV. Betreffend die Einwirkung von frischen und gärenden Kraftfuttermitteln auf Milch.

a) Wirkung auf gewöhnliche Konsummilch.

1. Eine für alle Fälle gültige Regel über die Einwirkung von frischen und gärenden Kraftfuttermitteln in der in unseren Versuchen zur Anwendung gekommenen Menge von $^1/_{100}$ g auf 100 ccm Milch, läßt sich nicht wohl aufstellen. Im allgemeinen gilt:

2. Die Impfung oder — was in der Praxis auf das Gleiche hinausläuft — Verunreinigung von Konsummilch mit der oben genannten Menge frischer Kleie, Sesam- oder Erdnußkuchen und -mehle, vermag in der Mehrzahl der Fälle keinen wesentlichen und durchgreifenden Einfluß auf die natürlichen Gärungsvorgänge in der Milch auszuüben. Eine Ausnahme tritt am ehesten dann ein, wenn die geimpfte Milch bei 37° C aufbewahrt wird. Der Einfluß der Impfung kann sich in diesem Falle in einer früher eintretenden makroskopischen Veränderung der Milch und in einer stark gesteigerten Gasbildung geltend machen.

3. Kleie, Erdnuß- oder Sesammehle und -kuchen in gärendem Zustande in kleinen Mengen ($^1/_{100}$ g pro 100 ccm) in die Milch eingeimpft, bewirken bei 37° C regelmäßig eine frühere makroskopisch wahrnehmbare Veränderung der geimpften Milch gegenüber den nicht geimpften Kontrollproben. Außerdem sind in der Regel auch eine stärkere Gasbildung und eine entsprechende Abweichung vom Artenbestand festzustellen. Wird hingegen die geimpfte Milch bei 22° oder 12° C aufgestellt, so ist ein deutlicher Einfluß durch das Impfmaterial in der Mehrzahl der Fälle nicht wahrnehmbar.

4. In unreinlich gewonnener, also schon bakterienreicher Milch, oder in gewöhnlicher, etwas älterer Marktmilch, vermögen die in Frage stehenden Futtermittel weder in frischem, noch in gärendem Zustande irgendeinen nachweisbaren Einfluß auf die natürlichen Umsetzungsvorgänge in der Milch auszuüben.

b) Wirkung auf sterilisierte Milch.

1. Sterilisierte Milch, die mit Kleie, Erdnuß- oder Sesammehlen oder -kuchen frisch oder in gärendem Zustande geimpft wird, zeigt, wenn die geimpften Proben bei 37° C aufbewahrt werden, eine frühere, makroskopisch wahrnehmbare Veränderung, vor allem eine stark gesteigerte Gasentwicklung, gegenüber den mit analogem Impfmaterial beschickten Parallelproben gewöhnlicher Konsummilch.

2. Sowohl bei gewöhnlicher Konsummilch, als auch bei der geimpften sterilisierten Milch gewinnt die Gruppe der Milchsäurebakterien nach kürzerer oder längerer Gärdauer immer in mehr oder weniger ausgesprochener Weise die Oberhand. Bei 37° C entwickeln sich in sterilisierter Milch die durch das Impfmaterial übertragenen Gasbildner viel üppiger als in Konsummilch; bei 12° C kommen außer den Milchsäurebakterien die Fluoreszenten häufig in großer Menge vor.

3. Unsere Versuche zeigen in Übereinstimmung mit den Befunden von

Silberschmidt, Sidler, Chodat und Hoffmann, Boekhout und Ott de Vries und anderen, daß das Bacterium Güntheri L. et N. sich in frischer Konsummilch bedeutend besser entwickelt, als unter sonst gleichen Verhältnissen in sterilisierter Milch. Auch erweist sich das Säurebildungsvermögen von Bacterium Güntheri L. et N. (= Bacterium lactis acidi Leichmann = Streptococcus acidi lactici Grotenfeldt = Streptococcus lactis (Lister) Löhnis in Konsummilch ganz bedeutend größer als in sterilisierter Milch.

4. In sterilisierter Milch, die mit frischem oder gärendem Kraftfutter geimpft wird, entwickelt sich im allgemeinen eine qualitativ reichere Mikroflora, als unter den nämlichen Bedingungen in den korrespondierenden Konsummilchproben. Immerhin findet aber auch in sterilisierter Milch eine scharfe Auslese innerhalb der eingeimpften Arten statt.

V. Bemerkungen einige wichtige isolierte Arten betreffend.

1. Bacillus anthracis F. Cohn und Koch kann in Kleie in virulenter, infektionsfähiger Form vorkommen. Durch diesen für die Kleie zum erstenmal gelungenen Nachweis ist es möglich, das oft ganz unvermittelte und vielfach noch unaufgeklärte Auftreten von sporadischen Milzbrandfällen zu verstehen.

2. Bacillus putrificus coli Bienstock, ein Sporenbildner, welcher nach den neuesten Untersuchungen von Prof. Düggeli[1]) in den Kraftfuttermitteln, speziell im Erdnußmehl, oft vorkommt und in tierhygienischer Hinsicht eine sehr bedenkliche Rolle spielen kann, indem der genannte Spaltpilz als Ursache widerwilliger Annahme oder direkter Verweigerung des genannten Kraftfuttermittels durch die landwirtschaftlichen Nutztiere angesprochen wird, konnte in frischen Erdnußkuchen und -mehlen in 55 Proz., in den Sesamkuchen und -mehlen in 37 Proz. aller untersuchten Proben in kleinerer oder größerer Zahl nachgewiesen werden. — In der geimpften Milch vermag die genannte Art infolge regelmäßiger Überhandnahme der Milchsäurebakterien nur selten aufzukommen. Immerhin aber erscheint eine Verschleppung von Bacillus putrificus in die Milch, veranlaßt durch frische oder gärende Futtermittel, nicht ausgeschlossen und keineswegs begrüßenswert.

3. Bact. fluorescens liquefaciens (Flügge) L. et N. vermag in einer mit Kleie, Erdnuß- oder Sesammehl oder -kuchen geimpften Milch, bei Temperaturen von 20° C abwärts, einen mehr oder weniger intensiven Bittergeschmack hervorzurufen. Das Peptonisierungs- und Farbstoffbildungsvermögen dieser Bakterienart kann, nach den Ergebnissen unserer Untersuchungen, stark abgeschwächt werden, oder selbst ganz verloren gehen.

4. Die Beobachtung von Burri, daß die Vertreter aus der Gruppe der gasbildenden Milchsäurebakterien das Gasbildungsvermögen unter Umständen einbüßen können, fanden wir zu wiederholten Malen bestätigt.

5. Alle Arten von Kokken verschwinden in gärenden Kraftfuttermitteln regelmäßig in kurzer Zeit. In der Milch vermögen sie sich in der Regel nur 1—2 Tage entwicklungsfähig zu erhalten. In älteren, angesäuerten Milchproben sind die Kokken nur ganz selten noch nachweisbar.

---

[1]) Mündliche Mitteilung.

Literatur.

1. Aitken, Eine schnelle und genaue Bestimmung der Feuchtigkeit und des Öles in Leinkuchen und anderen Futterstoffen. (Ref. Chem. Centralbl. 1894. Bd. I. p. 743.
2. Appel u. Koske, Versuche über die Wirkung einiger als schädlich verdächtiger Futtermittel. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. p. 535.)
3. Babcock u. Russel, Die bei der Herstellung von Grünfutter (Silage) wirkenden Ursachen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. p. 81.)
4. Backhaus u. Appel, Bericht des landw. Institutes der Universität Königsberg i. Pr. Bd. 5. 1900. p. 73.
5. Balland, Über die Zersetzungen der in Frankreich eingeführten Reissorten. (Ref. Chem. Centralbl. 1895. Bd. 2. p. 1007.)
6. —, Einwirkung frischer Kleie auf altes Mehl. (Ref. Chem. Centralbl. 1898. Bd. 1. p. 600.)
7. Barthel, Chr., Beiträge zur Kenntnis des Vorkommens und der Verbreitung der Milchsäurebakterien außerhalb der Milch. (Ref. Milchwirtsch. Centralbl. 1908. p. 522.)
8. —, Untersuchungen über die Mikroorganismen der Stalluft, in der frisch gemolkenen Milch und im Euter der Kuh. (Milchzeitg. 1903. p. 627.)
9. —, Obligat anaërobe Bakterien in Milch und Molkereiprodukten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. p. 1.)
10. Bersch, W., Mais und Maisabfälle. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1895. p. 828.)
11. Bille-Gram, Über Rapskuchen und deren Verunreinigungen. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1895. p. 134.)
12. —, Über eine die Gelatine verflüssigende Milchsäurebakterie. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. p. 568; Bd. 18. p. 27.)
13. Bolley, Die Konstanz der Bakterien in normaler Rohmilch. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 1. p. 795.)
14. Bremer, W., Die Fett verzehrenden Organismen in Nahrungs- und Futtermitteln. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. p. 216.)
15. Brown, Beiträge zur Kenntnis der Erdnüsse. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 165.)
16. Brudny, V., Untersuchungen über die Bakterizidie der Milch und über die während der bakteriziden Phase auftretenden Anpassungen des Bact. coli commune Esch. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. p. 192.)
17. Burchardt, O., Reis und Reisabfälle. (Ref. Chem. Centralbl. 1897. Bd. 1. p. 427.)
18. Burri, R., Die Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. p. 756.)
19. —, Die Bakterienflora frisch gemolkener Milch gesunder Kühe. (Schweiz. landw. Jahrb. Bd. 21. p. 293.)
20. —, Über scheinbare plötzliche Neuerwerbung eines bestimmten Gärungsvermögens durch Bakterien der Coligruppe. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. p. 321.)
21. —, Milchsäurebakterien und Milchfehler. (Molkereitechn. Rundsch. 1908. No. 11/12.)
22. — u. Allemann, Chemisch-biologische Untersuchungen über schleimbildende Milchsäurebakterien. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910.)
23. — u. Düggeli, Bakteriologischer Befund bei einigen Milchproben von abnormaler Beschaffenheit. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. p. 709.)
24. Canello, Der Sonnenblumensamen als Futter. (Ref. Chem. Centralbl. 1903. Bd. I. p. 93.)
25. Collin, E., Rhizinus-Ölkuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1902. Bd. 1. p. 1237.)
26. Conn u. Esthen, Der Einfluß der Temperatur auf die Art der sich in der Milch vermehrenden Bakterien. (Ref. Milchwirtschaftl. Centralbl. 1905. p. 379.)
27. Cornevin, Untersuchungen über Samen und Ölkuchen von Rhizinus. (Ref. Chem. Centralbl. 1898. I. p. 445.)
28. —, Studien über das Gift der Baumwollsamen und Baumwollsamenkuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1897. Bd. 1. p. 515.)
29. Curtius u. Carion, Welche Wirkung übt die Verabreichung von Baumwollsamen und Baumwollsamenmehl an Milchkühe auf die Aufrahmung der Milch aus? (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 421.)
30. Dammann, Gesundheitspflege der landwirtschaftlichen Haustiere. (Ref. Futtermittel des Handels p. 683.)
31. —, Behrens u. Oppermann, Untersuchungen über von Tieren verschmähte Erdnußkuchen und -Mehle. (Deutsch. landw. Presse. 1896. p. 270.)

32. D'heil, Beiträge zur Frage des Bakteriengehaltes der Milch und des Euters. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 16. 1905. p. 84.)
33. Dietrich, Getrocknete Biertreber. (Ref. Chem. Centralbl. 1902. Bd. 1. p. 278.)
34. Dombrowsky, Die Hefe in Milch und Milchprodukten. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. p. 345.)
35. Düggeli, Die Bakterienflora gesunder Samen und der daraus gezogenen Keimpflänzchen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12 u. 13.)
36. Dyer u. Gilbard, Über das Vorkommen und die Menge freier Fettsäuren in Ölkuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1893. p. 515.)
37. Emmerling, A., Über Palmkerne und Palmkernkuchenmehl. (Ref. Chem. Centralbl. 1898. p. 1241.)
38. Emmerling, O., Über Schimmelpilzgärung. (Ref. Chem. Centralbl. 1897. p. 134.)
39. Erdnußölfabrikation, Rückstände der. (Die Futtermittel des Handels, herausgeg. v. Verband landw. Versuchsstat. Berlin 1906. p. 42.)
40. Esten, M., Milchsäurebakterien. (Ref. Kochs Jahresbericht 1906. p. 388.)
41. —, Milchsäurebakterien. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 536.)
42. —, Untersuchungen über den Säuregehalt frischer Milch. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 3. p. 226.)
43. Faßbender u. Kern, Über die Ursache niedriger Jodzahl bei Leinkuchenfetten. (Ref. Chem. Centralbl. 1897. p. 146.)
44. Freudenreich, v., Über das Vorkommen von Bakterien im Kuheuter. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. p. 401.)
45. —, Über die Bakterien im Kuheuter und ihre Verteilung in den verschiedenen Partien des Gemelkes. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. p. 281.)
46. — u. Thöny, Über die in der normalen Milch vorkommenden Bakterien und ihre Beziehung zum Käsereiprozeß. (Milchwirtschaftl. Centralbl. 1903. p. 628.)
47. Futtermittel, Die, des Handels. Berlin 1906.
48. Gebeck, Baumwollsaatmehl und Baumwollsamenkuchen. (Ref. Die Futtermittel des Handels. Berlin 1906.)
49. Gonnermann, M., Bakteriologische Untersuchungen der Futtermittel. (Chemik.-Zeitg. Jg. 18. p. 486.)
50. Gordan, Bakteriologische Untersuchungen zur Beurteilung von Kleie nach ihrer Neigung zur Schimmelbildung. (Landw. Versuchsstat. Bd. 60. 1904.)
51. Grimme, A., Einige Bemerkungen zu der Arbeit über die Morphologie des Milzbrandbacillus. (Kochs Jahresber. 1904. p. 46.)
52. Gruber, Th., Die beweglichen und unbeweglichen aëroben Gärungserreger in der Milch. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. p. 654 u. 711.)
53. —, Die Bakterienflora von Runkelrüben, Steckrüben, Karotten, von Milch während der Stallfütterung und des Weideganges, einschließlich der in Streu, Gras und Kot vorkommenden Mikroorganismen und deren Mengenverhältnis in den letzten 4 Medien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. p. 401.)
54. Grünhut, L., Über Sonnenblumenkuchenmehl. (Ref. Chem. Centralbl. 1894. p. 118.)
55. Hansen, Hecker u. Hoffmann, Die Verwendung indischer Rapskuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1903. Bd. 2. p. 681.)
56. Harrison, Eine vergleichende Untersuchung von 66 Arten gaserzeugender Milchbakterien. (Rev. génér. du lait. 1907. p. 265, 289, 315 u. 337.)
57. Haselhoff, Die Fabrikation und Beschaffenheit des Leinkuchens, bzw. Leinmehles. (Ref. Futtermittel d. Handels. 1906.)
58. —, Über Leinsamen und Leinmehl. (Ref. Chem. Centralbl. 1892. Bd. 2.)
59. —, Die Zersetzung der Futtermittel durch Schimmelpilze. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 18. p. 158.)
60. Hauptfleisch, Bakterien in Kleie. (Ref. Futtermittel d. Handels. 1906.)
61. Hebebrand, Über den Sesam. (Ref. Chem. Centralbl. 1898. Bd. 2. p. 939.)
62. Heinemann, Bakterienarten, die beim Sauerwerden der Milch beteiligt sind. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. p. 538.)
63. Heinrich, Über die Menge der Bakterien- und Pilzkeime in Futterstoffen. (Ref. Die Futtermittel d. Handels. Berlin 1906.)
64. —, Die Ranzigkeit des Fettes in käuflichen Futterstoffen. (Ref. Chem. Centralbl. 1890. p. 775.)
65. —, Vergleichende Versuche mit Hammeln bei Erdnuß- und Sesamfütterung. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 23.)

66. —, Erdnußschalenmehl und Erdnußabfallmehl. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 69.)

67. Heinze, B., Über die Mikroorganismen in Futtermitteln. (Landw. Mitteil. f. d. Prov. Sachsen. 1909. p. 174.)

68. Hiltner, Über die Beziehung verschiedener Bakterien und Schimmelpilze zu Futtermitteln und Samen. (Landw. Versuchsstat. Bd. 34. 1887. p. 397 u. Bd. 39. 1891. p. 470.)

69. —, Prüfung der Erdnußölkuchen. (Rev. intern. popul. et scient. des falsificat. d. deurées aliments. 7. p. 37.)

70. Hirt, C., Über peptonisierende Milchbazillen. (Ref. Kochs Jahresber. 1900. p. 245.)

71. Hoffmann, Wie groß ist die Zahl der Mikroorganismen auf dem Getreide unter verschiedenen Bedingungen? (Wochenschr. f. Brauer. 1896. p. 1153.)

72. — u. Spiegelberg, Über die Wasserstoffsuperoxyd zersetzenden Bestandteile der Kleie. (Ref. Chem. Centralbl. 1905. p. 903.)

73. Hölling, Das Verhältnis der Milchsäurebakterien zum Streptococcus lanceolatus. (Ref. Kochs Jahresber. 1904. p. 325.)

74. Hoppe, Zur Frage des Wertes der Melasse als Futtermittel. (Ref. Chem. Centralbl. 1900. p. 777.)

75. Hunt, Über den komparativen Wert des Baumwollsaatmehles für Butterproduktion, verglichen mit der Kleie. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1893. p. 279.)

76. Javorowsky, Verfälschung von Leinmehl und Senfmehl. (Ref. Chem. Centralbl. 1897. I. p. 208.)

77. Jensen, O., Untersuchungen über einige Milch- und Butterfehler. (Ref. Centralbl. f. Bakt. 1892. p. 628.)

78. von dem Barghe, Jules, Ausführlicher Bericht über Verunreinigungen und Verfälschungen des Leinkuchens. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1890. p. 211.)

79. Kellner, O., Köhler, Zielstorf u. Barnstein, Untersuchungen über die Verdaulichkeit des entgifteten Rhizinusmehles. (Ref. Chem. Centralbl. 1896. p. 628.)

80. Knieriem, Untersuchungen betreffend Wert verschiedener Kraftfuttermittel. (Landw. Jahrb. Bd. 27. p. 566.)

81. König u. Spieckermann, Beiträge zur Zersetzung der Futter- und Nahrungsmittel durch Kleinlebewesen: Die Zersetzung der pflanzlichen Futtermittel durch Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 10. 1903 u. Bd. 11. 1904. p. 61.)

82. —, — u. Bremer, Beiträge zur Zersetzung der Futter- und Nahrungsmittel durch Kleinlebewesen. (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. p. 88.)

83. —, — u. Kuttenkeuler, Die Zersetzung der pflanzlichen Futtermittel bei Luftabschluß. (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmitt. Bd. 11. p. 177.)

84. —, — u. Olig, Die Zersetzung pflanzlicher Futter- und Nahrungsmittel durch Bakterien. (Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmitt. Bd. 6. p. 193.)

85. Kosutany, Sonnenblumenkuchen und Kürbiskernkuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1894. p. 434.)

86. Kühl, Bakteriologische Untersuchung eines als Trockentreber bezeichneten Futtermittels. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1909. p. 347.)

87. Lehmann u. Neumann, Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. München 1907.

88. Liebenberg, Fütterungsversuch mit Rapskuchen. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1895. p. 631.)

89. Loges, Über Kleiefälschung. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 28.)

90. —, Die Kleieuntersuchung an der Versuchsstation Posen im Jahre 1890. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1891. p. 459.)

91. Löhnis, Die Benennung der Milchsäurebakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 22. 1909. p. 553.)

92. —, Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie. Berlin 1910.

93. Lominsky, Über den Parasitismus einiger pathogener Mikroben auf lebenden Pflanzen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 8. p. 325.)

94. Lux, A., Über den Gehalt der frisch gemolkenen Milch an Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. p. 195 u. 267.)

95. Malkoff, Untersuchungen über die Bakterienkrankheit auf Sesamum orientale. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. p. 664.)

96. Neubauer, N., Futtermitteluntersuchung. (Jahresber. üb. d. Tätigk. d. Versuchsstat. d. landw. Ver. f. Westpreußen. 1905.)

97. Märcker, Bericht über einige Vorkommnisse auf dem Gebiete des Handels mit Futtermitteln. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 92.)
98. Marpmann, Das Vorkommen von anaëroben Bakterien in frischer Kuhmilch. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 21. p. 280.)
99. Mieczyslaw, Bacterium lactis aërogenes in der Milch. (Milchzeitg. 1903. p. 817.)
100. Moser, Peter u. Käppeli, Einfluß der Sesamfütterung auf den Milchertrag und die Qualität von Milch, Butter und Emmentaler. (Beil. z. Jahresber. d. Molkereischule Rütti. 1904/1905.)
101. Nagl, O., Rhizinusölkuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1902. p. 540.)
102. Peter, A., Die in der Schweiz am häufigsten vorkommenden Milchfehler und ihre Verteilung auf die verschiedenen Gebiete. (Schweiz. Milchzeitg. 1902. No. 34.)
103. —, Ein Beitrag zur Kenntnis der fadenziehenden Milch. (Schweiz. Milchzeitg. 1903. No. 16.)
104. Pollet, Lacomb u. Lesceour, Vergiftungen des Rindviehes durch Rapskuchen. (Journ. Pharm. chim. 1893. p. 538.)
105. Pott, E., Handbuch der tierischen Ernährung und der landwirtschaftlichen Futtermittel. Bd. 3.: Spezielle Futtermittellehre. Berlin 1909.
106. Presse, Deutsch. landw., Bakterien des Getreides. 1896. p. 121.
107. —, — —, Rindviehsterben in Deutschland, besonders in Schleswig-Holstein durch Erdnußmehlverfütterung. 1896. p. 497.
108. Ramm u. Mintrop, Die Wirkung von Sesamkuchen und Sesamöltränke auf die Milchsekretion und Butterqualität. (Ref. Chem. Centralbl. 1898. p. 1139.)
109. —, Momsen u. Schumacher, Fütterungsversuche mit Palmkernkuchen, Palmkernschrot, Leinmehl, Rhizinusmehl und Erdnußmehl bei Rindvieh. (Milchzeitg. 1900. p. 291.)
110. Reitmair, Über Veränderlichkeit einiger Futtermittelfette. (Landw. Versuchsstat. Jg. 38. 1891. p. 373.)
111. Reszler, J., Fälschung von Futtermitteln. (Ref. Chem. Centralbl. 1894. p. 92.)
112. Schindler u. Waschata, Neuere Erfahrungen aus der Praxis der Ölsamen- und Ölkuchenuntersuchung. (Ref. Chem. Centralbl. 1904. p. 1171.)
113. Schjerning, Über die Bestimmung des Proteïngehaltes der Futtermittel. (Ref. Chem. Centralbl. 1901. p. 66.)
114. Schlicht, A., Beurteilung der Rapskuchen nach ihrem Senfölgehalt. (Landw. Versuchsstat. Bd. 41. p. 176.)
115. Schulze, B., Studien über den Sandgehalt der Handelsfuttermittel. (Landw. Versuchsstat. Bd. 47. p. 361.)
116. Schultze, H., Welche Rücksichtnahmen sind bei Ankauf und Verfütterung der Mehlabfälle wie Kleie, Graupenschlamm usw. geboten? (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 244.)
117. Schröder, A., Untersuchung über den Einfluß der Kühlung auf die Haltbarkeit und den Keimgehalt der Milch. [Diss. Leipzig.] Dresden 1908.
118. Sievert, M., Vergleichszahlen über den Gehalt deutscher, englischer und polnisch-russischer Rapskuchen. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1890. p. 502.)
119. Sjollema, Entwicklung und schädliche Wirkung von Senföl auf Rapskuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1900. Bd. 2. p. 592.)
120. Spieckermann u. Bremer, Veränderung fettreicher Futtermittel beim Schimmeln. (Landw. Jahrb. Bd. 31. 1901. p. 825.)
121. — —, Untersuchung über die Veränderung von Futter- und Nahrungsmitteln durch Mikroorganismen. (Landw. Jahrb. Bd. 31. 1901. p. 81.)
122. Stellwag, A., Die Zusammensetzung der Futtermittelfette. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1890. p. 384.)
123. Stutzer, A., Nachweis der Wertverminderung der Ölkuchen durch starke Erhitzung. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1892. p. 515.)
124. Theodor, R., Über Sonnenblumenkuchenmehl. (Orig. Chemikerzeitg. 1893. p. 531.)
125. Tuinzing, Aufbewahren von Futterkuchen. (Landw. Versuchsstat. Bd. 56. p. 153.)
126. Uhl u. Henzold, Bittere Kindermilch. (Milchzeitg. 1900. p. 65.)
127. Uhlmann, O., Der Bakteriengehalt des Zitzenkanals bei der Kuh, der Ziege und dem Schafe. [Diss.] Jena 1902. (Ref. Kochs Jahresber. 1903. p. 299.)
128. Uhlitzsch, Rückstände der Erdnußölfabrikation. (Landw. Versuchsstat. Bd. 41. p. 385.)

129. **Weigmann, H.**, Versuche über die Frage, ob bei Sesamfütterung Stoffe in die Butter übergehen, die die Baudouinsche Reaktion geben. (Ref. Chem. Centralbl. 1898. p. 672.)
130. **Weiske**, Über die Verluste und chemischen Veränderungen, welche die vegetabilischen Futtermittel infolge langen Aufbewahrens bei hoher Temperatur erleiden. (Landw. Versuchsstat. Bd. 48. 1897. p. 379.)
131. **Werenskiold**, Untersuchungen über einige giftige Bestandteile des Rapskuchens. (Ref. Centralbl. f. Agrikulturchem. 1895. p. 135.)
132. —, Beiträge zur Beurteilung der Rapskuchen. (Ref. Chem. Centralbl. 1895. p. 1131.)
133. **Widen**, Über die Ursache der Vorweigerung der Erdnußkuchen bei Kühen. (Deutsch. landw. Presse. 1906. p. 171.)
134. **Wolff, A.**, Übersicht über die Arten der Milchsäurebakterien Bem. z. milchw. Bakteriol. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. p. 417.)
135. —, Versuche über das Wesen bitterer Milch. (Milchwirtschaftl. Centralbl. 1909. p. 67.)
136. **Wood u. Wilcox**, Beiträge „zur Natur“ der Kleiegärung. (Journ. of the Soc. of chim. Industr. Vol. 12. 1892. p. 422.)
137. — —, Über Reinkultur eines Bacillus der Kleiegärung. (Ref. Chem. Centrabl. 1897. p. 371.)
138. **Wüthrich u. Freudenreich**, Über den Einfluß der Fütterung auf den Bakteriengehalt des Kuhkotes. (Jahresber. d. Molk.-Schule Rütti. 1894.)

Referate.

Kleine, R., Die Kümmelmotte Schistodepressaria nervosa Hw. Ein Beitrag zu ihrer Biologie und ihrer Bedeutung für die Landwirtschaft. (Zeitschr. f. wissenschaftl. Insektenbiol. IX. 1913. p. 37—41, 69—72, 105—109, 143—148, 183—190.)

Die Überwinterung erfolgt im Imagozustand (durch die Zucht auch bewiesen) an geschützten Orten. Daher darf man das gedroschene Kümmelstroh nicht in geschlossenem Raume aufbewahren. Die Männchen sterben aber im Herbste gewöhnlich ab. Flugzeit lang (bis Ende Mai), bei Tage ist die Motte versteckt. Die Eier werden oft zu dreien in der Rille des Blattstieles abgesetzt. Die Veränderungen an der Mikropyle des Eies werden erläutert, Dauer des Eizustandes 9—10 Tage. Wirklich variabel ist die Raupe nur im dritten Kleide. Puppe 10 mm, tief braunschwarz bis hell-rotbraun oder schwarz; Form und Art der Cremasterbehaarung ist für die Identität der Art wichtig. Die Räupchen fressen nur an der Innenseite des Stengels, ganz unten bei der Basis, jede für sich. Häutungen im Hohlraum zwischen Stengel und Blattscheide, wo viele Raupen sich versammeln. Dann ein geselliger Fraß. Die Blätter sterben ab. Die Raupen trennen sich dann wieder und der erste Fraß beginnt diesmal an den Blütenstielen. Die Döldchen sterben ab, da der Zirkulationsstrom unterbrochen wird, nachdem sie zusammengesponnen werden. Nach der zweiten Häutung wandert ein Teil in die Achseln der Blattstengel. Es wird von jetzt an in den Dolden und im Stengel stark gefressen. Die Pflanze muß jetzt eingehen, wenn auch die Blätter intakt sind; sie erscheint jetzt von dem vielen Kot schwarz gesprenkelt. Während dieses starken Fraßes kommt jetzt die dritte Häutung zustande. Verpuppung vom 19. Mai bis 7. Juni, nach etwa 33 Tagen im Mittel, und zwar im Stengel, wobei die Fraßspäne herausgeschafft werden. Puppenraum 5 mm. Das Mark des Stengels wird nie gefressen. Das Loch wird mit einem zarten Deckel fest abgesperrt, das aus Chitin besteht. Selten eine Verpuppung außerhalb des Stengels. Jährlich nur eine Generation. Sorauer erwähnt schon die Parasiten der Puppe; Verf. fügt Eulimneria costalis Thoms. dazu (recht häufig). Außerdem treten Pilze auf. Nährpflanzen: Viele Umbelliferen-Arten, doch keine aus der Coriandrum- und Hydrocotyle-Gruppe.

Bekämpfung: Durch Zerstörung des Blütenstandes unterbleibt der Fruchtansatz. Für Sachsen, wo auch Flächen bis zu 100 preußischen Morgen Größe vorkommen, wurden verschiedene Bekämpfungen versucht, doch ohne Erfolg. Es muß die Puppe bekämpft werden: Der Schnitt muß aufs äußerste beschleunigt und der Ausdrusch sich dem Schnitt sobald nur möglich angeschlossen werden. Die Schlüpfzeit liegt etwas später als das Erntedatum, daher diese Periode auszunützen ist; die Hauptmasse der Puppen wird getroffen. Wenn auch beim Drusch nicht alle Puppen vernichtet werden, so muß zur Vervollständigung das Stroh gleich in die Strohpresse gebracht werden (dem Falter wird das Schlüpfen verwehrt), oder es muß verbrannt werden. Sogleich gänzliche Abhilfe zu schaffen wird nicht gelingen, doch nach und nach. Allenfalls mehrjährige Unterbrechung des Anbaues von Kümmel. Wird irgendwo der Kümmel zum erstenmal als Kulturpflanze angebaut, so beachte man die Pflanzengemeinschaften und stelle einen Probebau an. Matouschek (Wien).

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien etc.

Kühl, H., Der desinfektorische Wert des reinen und des Quecksilbercyanid haltenden Quecksilberoxycyanids. (Arch. d. Pharm. Bd. 251. 1913. H. 5.)

Die Arbeit wurde veranlaßt durch die Tatsache, daß das Quecksilberoxycyanid des Handels stets wechselnde Mengen Quecksilbercyanid enthält, mithin alle bakteriologischen Prüfungen in Kliniken nicht mit reinem Oxycyanid ausgeführt wurden.

Die Untersuchungen dehnten sich aus auf eine Prüfung der Reizwirkung, der wachstumshemmenden Wirkung, der bakteriziden Wirkung auf Bakterien und Bazillen.

Man darf es fast als allgemeine Regel hinstellen, daß die an sich wirksame Lösung eines Giftstoffes in äußerst schwacher Konzentration die Entwicklung niederer pflanzlicher Organismen fördert. Sobald aber die Konzentration eine bestimmte Stärke erreicht hat, tritt eine Wachstumshemmung ein und in wiederum stärkerer Konzentration bewirkt die Lösung desselben Giftstoffes den Tod des Organismus. Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß die bakterizide Wirkung nicht immer mit wachsender Konzentration sich gleichmäßig steigert.

Die jetzt folgenden Analysen beziehen sich auf zwei Präparate mit verschiedenem Gehalte an Oxycyanid. Das Präparat von Merk, vom Autor kurzweg als M bezeichnet, enthält 66,6 Proz. Cyanid, das Präparat von Holdermann, als H bezeichnet, dagegen 99 Proz. Oxycyanid.

Als Test diente bei der Bestimmung der Reizwirkung ein Colistamm[1]). Das Resultat ist folgendes:

Konzentration	Gefundene Keimzahl pro ccm	Wirkliche Keimzahl pro ccm	Keimzunahme pro ccm
M $^1/_{100\,000}$	2480	2728	2206
M $^1/_{200\,000}$	2840	3124	2602
H $^1/_{400\,000}$	2775	3051	2529
H $^1/_{200\,000}$	2830	3113	2591
Kontrollkultur	2050	2050	1528

Die tabellarische Zusammenstellung läßt deutlich erkennen, daß das Quecksilberoxycyanid in wäßrigen Lösungen sehr geringer Konzentration auf das Wachstum niederer Organismen fördernd wirkt. Bemerkenswert ist, daß das Merksche Präparat, das nur 33,3 Proz. Quecksilberoxycyanid enthält, dem Holdermannschen durchaus nicht nachsteht.

Bestimmung der wachstumhemmenden Wirkung. In bestimmten Konzentrationen vermag jedes Desinfektionsmittel die Entwicklung niederer pflanzlicher Organismen zu hemmen. Der hemmende Einfluß kann sich in dreierlei Weise äußern, nämlich:

1. Die Virulenz wird aufgehoben, es werden z. B. durch Gärungsorganismen keine Gärprozesse ausgelöst. In diesem Falle kann man auf rein chemischem Wege die Hemmung konstatieren.
2. Die Entwicklung sporenfreier Bakterien wird sistiert.
3. Das Auskeimen der Sporen wird verhindert.

In der ersten Versuchsreihe wird der Einfluß der Präparate auf die Milchflora festgestellt.

Präparat	Konzentration	Hemmung
M	0,005 %	+
H	0,005 %	+
M	0,0005 %	—
H	0,0005 %	—

Hemmung ist durch +, Ausbleiben derselben durch — angedeutet.

In der zweiten wird die Einwirkung der Präparate auf die ammoniakalische Gärung des Harnes ermittelt und festgestellt, daß beide zur Verfügung stehende Präparate in 0,005-proz. Lösung noch Wachstumshemmung erzeugen (vergl. erste Versuchsreihe).

Der Verf. wendet sich dann der Bestimmung der bakteriziden Wirkung zu. Um sichere Schlüsse ziehen, beide Präparate einwandsfrei miteinander vergleichen zu können, sucht er folgende Fragen experimentell zu beantworten.

1. Wie stark ist die Giftwirkung bei dem einen und dem anderen Präparat gegenüber Rohkulturen im natürlichen Substrat ?
2. Wie stark ist die bakterizide Wirkung gegenüber Rohkulturen im künstlichen Nährboden ?
3. Wie verhalten sich die Präparate gegenüber Reinkulturen ?

---

[1]) Die Testkultur enthielt pro ccm 522 Keime.

Bei der Bestimmung der bakteriziden Wirkung legt der Autor seine Untersuchungen, die als Reizwirkung geringer Giftmengen bekannte Kraft zugrunde und verzichtet darauf, den Giftstoff völlig zu entfernen, in der Annahme, daß äußerst geringe Mengen des Giftstoffes das Untersuchungsresultat nicht beeinflussen.

Als Test wird zunächst die Flora roher Milch benutzt. Das Resultat ist, daß 1 mg Hydrargyrum oxycyanatum nach Holdermann genau in derselben Weise wie das nach Angabe von Prof. Dr. Rupp nur 33,3 Proz. Oxycyanid haltende Merck sche Präparat wirkt. 1 mg wirkt in 25 ccm Rohmilch stark hemmend auf das Wachstum der Bakterien, 3 mg sind für die Streptokokken bei dreitägiger Einwirkung bakterizid, 5 mg genügen, alles organische Leben zu vernichten.

In der zweiten Versuchsreihe wird stark tuberkulöse Milch als Testmaterial benutzt. Der Autor geht aus von Lösungen der Präparate 1 : 500 und verfährt wie folgt: Kleine, vorher im Autoklaven sterilisierte Leinenläppchen, Größe ca. 2 qcm, werden in die tuberkulöse Milch gebracht, in der sie ¼ Stunde belassen werden. Darauf überführt er unter Innehaltung steriler Bedingungen a) zwei Läppchen in die Lösung M 1 : 500, b) zwei andere in die Lösung H 1 : 500, c) zwei weitere endlich in 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung. In den Salzlösungen beläßt er die Läppchen ½ Stunde, während dieser Zeit sorgt er durch Umschwenken des mit Wattebausch verschlossenen Glases für möglichst gute Durchdringung der Läppchen mit dem Giftstoff. Beobachtet wird hierbei, daß die milchige Flüssigkeit schlierenförmig in die Desinfektionsflüssigkeit sinkt, und daß bei dem Präparat nach Merck eine Klärung erfolgt. Von der Desinfektionsflüssigkeit werden die Läppchen in 500 ccm physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Die Anordnung ist, um eine Anreicherung des Giftstoffes in der Kochsalzlösung zu vermeiden, so getroffen, daß für jeden Desinfektionsversuch und für den Kontrollversuch jedesmal 500 ccm sterile Kochsalzlösung Verwendung finden. Nach gutem Auswaschen des anhaftenden Giftstoffes, welches 10 Minuten beanspruchte, bringt der Verf. die Läppchen in sterile, noch etwas warme, etwa Körperwärme haltende Petrischalen und überschichtet sie mit noch gerade flüssigem Glyzerinagar. Nach dem gleichmäßigen Erstarren des Agars werden die Petrischalen in feuchter Kammer bei 37—38° C im Brutschrank belassen. Beobachtet wird drei Tage hindurch. In dieser Zeit zeigen weder die Kulturen M noch H irgendwelches Wachstum. Da keine Tierversuche angeschlossen wurden, erklärt der Verf. selbst den Versuch für nicht einwandsfrei.

In der dritten Versuchsreihe wird die Flora einer exhumierten Leiche als Test benutzt. Es zeigt sich, daß beide Präparate in der Konzentration 1 : 500 bakterizid wirken, während die Lösungen 1 : 1000 nicht mehr ausreichen zur Tötung der sporogenen Fäulniserreger.

Im Verlaufe der nunmehr folgenden Untersuchungen stellt der Autor den bakteriziden Wert der Präparate gegenüber Staphylococcus pyogenes fest bei ½-stündiger Einwirkung der Desinfektionsmittel und kommt zu dem in der Tabelle festgelegtem Ergebnis.

Um diese zunächst auffallende Erscheinung zu ergründen, daß beide Präparate trotz des verschiedenen Oxycyanidgehaltes die gleiche Wirkung äußern, wird eine weitere Versuchsreihe angeordnet, in der die Wirkung des reinen Hydrargyrum oxycyanatum mit einem Präparat verglichen wird, das aus zwei Teilen des reinen Salzes und einem Teil Kochsalz besteht. Als Testmaterial dienen kleine Leinenläppchen 2×2 cm, die mit einer Aufschwemmung von Staphylococcus pyogenes in physiologischer Kochsalzlösung behandelt sind.

Wachstum.

Kultur	Nach 1 Tage	Nach 2 Tagen	Nach 3 Tagen
A 1 : 250	0	0	0
A 1 : 500	0	0	0
A 1 : 600	0	0	0
A 1 : 700	0	0	0
A 1 : 750	0	0	0
A 1 : 800	+	+	+
A 1 : 900	+	+	+
A 1 : 1000	+	+	+
B 1 : 250	0	0	0
B 1 : 500	0	0	0
B 1 : 600	0	0	0
B 1 : 700	0	0	0
B 1 : 800	0	0	0
B 1 : 900	+	+	+
B 1 : 1000	+	+	+

Aus den Versuchen resultiert, daß der Kochsalzzusatz eine Erhöhung der Desinfektionskraft bedingt.

Eine Vermehrung des Kochsalzgehaltes hat, wie der Autor weiterhin feststellen kann, keine Steigerung der desinfektorischen Wirkung zur Folge. Werden zwei Teile Kochsalz mit einem Teil Oxycyanid gemischt, so liegt die Grenze der bakteriziden Wirkung bei der Konzentration 1 : 700.

Das Gesamtresultat ist folgendes:

1. Setzt man zu der Lösung eines Giftstoffes in Wasser die Lösung eines an sich geringer bakteriziden Salzes, so wird die Giftwirkung nicht immer herabgedrückt, wie Krönig und Paul fanden. Zunächst ist festzustellen, daß den OH-Ionen eine große Bedeutung zukommt, sodann den von Spiro und Bruns zuerst gefundenen Beziehungen zwischen Giftstoff und Lösungsmittel einerseits sowie Giftstoff und Protoplasma andererseits.

2. Den OH-Ionen fällt eine bedeutende Rolle zu, von noch größerer Bedeutung aber sind die Beziehungen zwischen Protoplasma des Zelleibes und Giftstoff. Die stärkere Desinfektionswirkung bei Zusatz von Chlornatrium im Verhältnis 1 : 2 ist darauf zurückzuführen, daß die Beziehungen zwischen Giftstoff und Protoplasma begünstigt werden. Es findet also keine Verstärkung des Giftstoffes statt, das Chlornatrium an sich ist desinfektorisch wenig wirksam, aber es wird die Aufnahme des Giftstoffes vom Protoplasma begünstigt.

3. Eine einheitliche, erschöpfende Theorie läßt sich nicht aufstellen, die von Krönig und Paul geschaffene Lehre kann wohl als Richtschnur dienen, sie darf aber keineswegs verallgemeinert werden, da die biologischen Verhältnisse nicht genügende Berücksichtigung finden. Das lebende Protoplasma in allen Funktionen verhält sich wesentlich anders als das tote, es ist unmöglich, die Zelle in eine starre Formel hineinzubringen. Es tritt dieses am schärfsten zutage, wenn wir den Giftstoff einmal im eiweißhaltigen Substrat, einmal in destilliertem, sterilem Wasser mit den Testbakterien zusammenbringen. Im günstigen Nährboden widersteht die Bakterie viel mehr dem Desinfektionsstoff.

Literatur.

1. Krönig und Paul, Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. (Zeitschr. f. Hyg. 25. p. 1.)
2. Spiro und Bruns, Zur Theorie der Desinfektion. (Arch. f. experiment. Pathol. u. Pharmokol. 41. p. 355. 1899.)

Autoreferat.

Frei, W., Versuche über Kombination von Desinfektionsmitteln. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 75. 1913. p. 433—497.)

Im ersten Teile der Arbeit beginnt Verf. mit der Begründung der Kombination von Desinfektionsmitteln, welche bekanntlich die Wasserlöslichkeit des Steinkohlenteers und seiner Destillationsprodukte unter Erhöhung der Desinfektionswirkung herbeiführen soll. Nach der Mitteilung, daß bereits 1860 J. Lemaire unter Seifenlösung-Zusatz eine Steinkohlenteeremulsion herstellte, geht Frei auf die neuere Zeit über und führt die hierbei gehörigen Arbeiten an, von welchen diejenigen über Zusätze von Sublimat, Teerprodukte-Seifenmischungen, Lösung von Kresolen in Wasser, Kresol und salizylsaurem Natron und anderen besprochen werden. Die Versuche Rotters, durch Mischung verschiedenster Desinfektionsmittel die Giftwirkung der üblichen Konzentrationen zu vermeiden, sind infolge der unvollkommenen Technik nicht erfolgreich gewesen. Unabhängig hiervon hat dann Henle ähnliche Versuche gemacht und darauf hingewiesen, daß die Desinfektionskraft des Gemisches gleich sei der Summe der Desinfektionskraft beider Komponenten, hinter ihr zurückbleiben, sie aber auch übertreffen kann, und gelang es ihm, hierfür an dem Kreolin Pearson den Beweis zu erbringen. — Dann kamen noch weitere Arbeiten dieser Art zur Ausführung, deren Mischungen entweder verstärkte, aber auch verminderte Wirkungen ergaben, bis es Reichenbach gelang, in seiner Arbeit „Die desinfizierenden Bestandteile der Seifen" nachzuweisen, daß durch Hinzufügen kleiner, an sich ganz unwirksamer Seifenmengen die Desinfektionskraft von Kalilauge sehr gesteigert werden kann. Da aber Reichenbach es nie versuchte, eine Erklärung dieser Tatsache festzustellen, so hat Frei auf des ersteren Veranlassung hin erweiterte Versuche unternommen und neue Kombinationen hergestellt, um aus denselben möglicherweise eine Gesetzmäßigkeit in der Wirkung derselben ableiten zu können. Zunächst kommen Angaben über die Versuchstechnik, dann theoretische Betrachtungen und hierauf Kombinationen von Substanzen, die chemisch oder physikalisch aufeinander einwirken und ferner solche Kombinationen, welche chemisch nicht aufeinander einwirken. Die Versuche mit fettsauren Salzen sind ganz besonders ausgedehnt und fand sich dabei neben anderen Ergebnissen, daß bei allen fettsauren Salzen die verstärkte Wirkung durch Kombination mit Lauge auftrat, allerdings mit gewaltigen Unterschieden. Das Maximum der Wirkung lag bei der Kombination stets ungefähr an der gleichen Stelle, in der ersten Hälfte der Kurve (s. Tab. X bis XXV). Hiernach folgen die Seifen und Phenole (Tab. XXVI—XXXVI). Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß beispielsweise die Vorbehandlung mit Seife keinerlei Einfluß auf die Desinfektionswirkung der Kalilauge ausübte und ferner, daß es keinen Unterschied für die Laugenwirkung machte, ob man die Bakterien mit Seife vorbehandelt hatte oder nicht. — Mehrfach modifizierte Versuche dieser Art zeigten bei einer Kontrolle, bei welcher unvorbehandelte Bakterien in eine Kalilauge eingesät wurden, die mit der gleichen Seifenmenge versetzt war, auch einen starken Vorsprung gegenüber einer

Kontrolle, bei der ebenfalls unbehandelte Bakterien in Kalilauge ohne Seifenzusatz sich befanden.

Bei Versuch 32 ergab sich, daß bei einer Abtötung der Bakterien durch Lauge + Seife es von Vorteil war, wenn die an sich unwirksame Seife schon vorher mit den Bakterien in Berührung war, während eine vorhergehende kurze Einwirkung von Lauge gleichgültig ist.

Aus seiner sehr sorgfältigen und ausgedehnten Arbeit zieht Verf. die nachstehenden Schlüsse:

Es wurde die Theorie der Kombinationswirkung von Desinfektionsmitteln erläutert und der Begriff der Iso- und Hetero-Addition und der Verstärkung resp. Abschwächung definiert. Die Kombinationswirkung ließ sich zurückführen: 1. Auf chemische Umsetzungen: Als Beispiel für eine Abschwächung wurde die Kombination von Kalilauge mit Salzsäure und mit Phenol untersucht. Verstärkungen durch derartige Vorgänge wurden nicht beobachtet. Die Angaben der Literatur über die Wirkung des Gemisches von Schwefelsäure und Kresol konnten durch die vorliegenden Versuche nicht voll bestätigt werden. 2. Auf physikalisch-chemischen Veränderungen: Hierauf beruht die Verstärkung der Phenolwirkung durch Kochsalzzusatz. 3. Auf das Zusammenwirken der unverändert gebliebenen Substanzen: Hier ließ sich in zwei Fällen durch die Kombination nahe verwandter Substanzen (Phenol und Kresol, Äthyl- und Methylalkohol) Iso-Addition nachweisen. Ein Beispiel für Hetero-Addition wurde nicht gefunden. Dagegen wurde in zwei Fällen bei Kombination verschiedenartiger Substanzen (Phenol und Salzsäure, Alkohol und Kalilauge) eine Verstärkung hervorgerufen. Von dieser Verstärkungswirkung war die der Seifen wegen der fehlenden Eigenwirkung abzutrennen.

Die Verstärkungswirkung der Seifen beruht gleichfalls nicht auf einer gegenseitigen Beeinflussung der Substanzen in der Lösung, sondern sie kommt erst in der Bakterienzelle zum Vorschein. — Sie beruht sehr wahrscheinlich nicht darauf, daß Kalilauge, Phenol und Alkohol am Bakterium eine Seifenwirkung ermöglichen, sondern umgekehrt, daß die Seife auf die Bakterien so einwirkt, daß die anderen Substanzen eine intensivere Wirkung entfalten können. Diese Wirkung der Seife ist an ihre Gegenwart in der Desinfektionslösung oder wenigstens an der Bakterienzelle gebunden. Sie läßt sich durch eine Vorbehandlung der Bakterien nur dann hervorrufen, wenn die Seife an die Bakterienzelle gebunden bleibt und nicht durch Auswaschen entfernt wird. Die Wirkung ist nicht dadurch zu erklären, daß die Seife die Oberflächenspannung erniedrigt und dadurch der anderen Substanz das Eindringen in die Zelle erleichtert. Die Oberflächenspannung ist aber insofern von Einfluß, als von ihr die Stärke der Adsorption der Seife und damit der Grad der Wirkung abhängt. Die Wirkung der Seife auf die Bakterien ist völlig von der auf rote Blutkörperchen zu trennen. Rullmann (München).

Referate aus bakteriologischen und gärungsphysiologischen etc. Instituten, Laboratorien etc.

Herrmann, F., Jahresbericht der zoologischen Versuchsstation. (Ber. d. Kgl. Lehranst. f. Obst- u. Gartenbau zu Proskau 1912. Berlin 1913.)

In Zuchtversuchen mit dem Apfelblütenstecher (Anthonomus pomorum) zeigten die frisch ausgeschlüpften Jungkäfer ein beträchtliches Nahrungsbedürfnis; sie erzeugten an den dargebotenen Blättern Fraßstellen, welche an diejenigen der schwarzen Kirschblattwespe erinnerten. Ende Juni schon hörte die Nahrungsaufnahme auf und die Käfer versteckten sich unter den Rindenstücken, welche man ins Zuchtgefäß gelegt hatte. Eine weitere Mitteilung bezieht sich auf das Auftreten der aus Japan eingeschleppten Heuschreckenart Diestrammena marmorata in einem Warmhaus in Proskau; die Tiere fraßen große Löcher in Ananasfrüchte. Die Bekämpfung kann durch Ausräuchern der Gewächshäuser erfolgen.

Verf. prüfte ferner verschiedene Fanggürtel auf ihren Wert für die Bekämpfung des Apfelwicklers und führte Spritzversuche gegen Blatt- und Schildläuse aus. Einige Untersuchungen über Goldafter, Blausieb und Ringelspinner konnten nicht fortgesetzt werden, weil die Aufzucht dem Verf. mißlang. Schneider-Orelli (Wädenswil).

Bericht über die an der landw. Landes-Lehranstalt S. Michele im Jahre 1913 durchgeführten Versuche mit Pflanzenschutzmitteln. (Tiroler Landw. Bl. Jg. 33. 1914. p. 6.)

1. Versuche mit Schwefelkalkbrühe. a) Erprobung auf Rostbildung an Apfelfrüchten. In der empfohlenen Verdünnung waren die Resultate befriedigend. b) Gegen Mehlthau auf Äpfeln und Birnen. Auch hier waren die Bespritzungen von Erfolg begleitet, doch sind noch weitere Versuche nötig. Sehr beachtenswert ist, daß Bespritzungen im grellen Sonnenlicht (1—3 Uhr nachmittags) starken Blattabfall und Brandflecken auf dem an den Bäumen verbleibenden Laube verursachten, während Bespritzungen bis 9 Uhr vormittags oder ab 4 Uhr nachmittags keinerlei Schädigungen brachten. Diese Tatsache wird seitens der Praxis noch viel zu wenig beachtet. c) Gegen Fusicladium. Im zeitigen Frühjahr vorgenommene Versuche mißglückten vollständig, während bei späteren Bespritzungen die Sommertriebe verschont blieben. Ausgedehnter Versuche bedarf die Feststellung, ob die Schwefelkalkbrühe in der Wirkung die Kupferkalkbrühe im Klima Südtirols übertrifft oder zum mindesten erreicht. d) Gegen die Kräuselkrankheit der Pfirsiche. Die Winterbespritzung brachte vollen Erfolg und es kann die Schwefelkalkbrühe neben der Kupferkalklösung als durchgreifendes Bekämpfungsmittel angesehen werden. e) Gegen Schildläuse. Es wurde kein Erfolg erzielt. 2. Präparat Golaz. Von der Firma Golaz in Küßnacht-Zürich hauptsächlich gegen Blattläuse empfohlen. Wirkte in 1-proz. Lösung bei Birn- und Pflaumenbäumen ausgezeichnet. 3. Präparat Xex von gleichnamiger Aktiengesellschaft in Dübendorf, Schweiz. In 2-proz. Lösung wurden an Birnbäumen alle Blattläuse getötet, jedoch die Blätter deutlich geschädigt. Verdünntere Lösungen wurden noch nicht versucht. Gegen Blattläuse versagte das Mittel. 4. Präparat Raupus, von Fischer in Weinböhla i. S. War gegen Blatt- und Blutläuse erfolglos. 5. Creolinum viennense. Wirkte gegen Blutläuse nicht zufriedenstellend, besser gegen Blutläuse, verzeichnete aber bei Apfelbäumen erheblichen Blattschaden. Gegen Fusicladium kein Erfolg. 6. Lysokreosol, sowohl gegen Blut-, als auch Blattläuse zufriedenstellend; gute Wirkung nur gegen Schildläuse. 7. Antiparassit, ein wasserlösliches Obstbaumkarbolineum von ähnlicher Zusammensetzung wie Dendrin, erwies sich gegen die rote Schildlaus auf Birnbäumen von ziemlich zufriedenstellender Wirkung. Das Mittel

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

kann auch gegen Frostspanner und ähnliche auf der Rinde überwinternde Insekten empfohlen werden. 8. Lohsol, auch ein Obstbaumkarbolineum, gab gegen die Blutlaus gute Resultate. Stift (Wien).

Naumann, A., Die neuerbaute Station für gärtnerischen Pflanzenschutz am Königl. botanischen Garten zu Dresden. (Jahresber. d. Vereinig. f. angew. Botan. 10. (1912). 1913. p. 181—190.)

Unter diesem Namen wurde die pflanzenphysiologische Versuchsstation am Königl. botanischen Garten zu Dresden weiter ausgebaut. Durch Pläne und Abbildungen ist die Einrichtung der jetzigen Station erläutert.

Rippel (Augustenberg).

Clinton, G. P., Report of the Station Botanist 1911—1912. (Ann. Rep. of the Connecticut Agric. Exper. Stat. P. V. [1913] p. 341—453, 12 pl.)

Die Hauptresultate der ausführlichen Arbeit sind, soweit Pilze in Betracht kommen, folgende:

1. Diaporthe parasitica Murr erzeugt auch in den östlichen Staaten Nordamerikas die chestnut „bark disease"; doch kommt sie auch auf Quercus als Schädiger vor. Die Kulturen weisen nur das Konidienstadium mit allantoiden Sporen („Cytospora") auf. Keimung der Sporen in schleimigen Tropfen oft. Der genaue Vergleich der Pilzart mit Arten der Endothia ergab, daß er zu Endothia gyrosa als var. parasitica (Murr.) Clint. zu stellen ist. Mit dieser Varietät gelangen die Infektionen von jungen Bäumen der Castanea und Quercus sehr gut, nicht so aber mit der Normalform E. gyrosa. Verf. meint, daß der Pilz in Nordamerika einheimisch ist und schon seit langem die Castanea befällt. Dieser Baum litt in den letzten Jahren sehr stark durch Ungunst der Witterung; werde letztere besser, so werde auch die Erkrankung abnehmen.

2. Mitteilungen über Gymnosporangium japonicum Syd. in Connecticut auf der aus Japan eingeführten forma compacta des Juniperus chinensis. Matouschek (Wien).

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Wigger, A., Untersuchungen über die Bakterienflora einiger Kraftfuttermittel in frischem und gärendem Zustande, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Einwirkung auf Milch, p. 1.

Referate.

Kleine, R., Die Kümmelmotte Schistodepressaria nervosa Hw. Ein Beitrag zu ihrer Biologie und ihrer Bedeutung für die Landwirtschaft, p. 232.

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien.

Frei, W., Versuche über Kombination von Desinfektionsmitteln, p. 237.

Kühl, H., Der desinfektorische Wert des reinen und des Quecksilbercyanid haltenden Quecksilberoxycyanids, p. 233.

Referate aus bakteriologischen und gärungsphysiologischen etc. Instituten, Laboratorien etc.

Bericht über die an der landw. Landes-Lehranstalt S. Michele im Jahre 1913 durchgeführten Versuche mit Pflanzenschutzmitteln, p. 239.

Clinton, G. P., Report of the Station Botanist 1911—1912, p. 240.

Herrmann, F., Jahresbericht der zoologischen Versuchsstation, p. 238.

Naumann, A., Die neuerbaute Station für gärtnerischen Pflanzenschutz am Königl. botanischen Garten zu Dresden, p. 240.

Abgeschlossen am 8. Mai 1914.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. No. 9|10.

Ausgegeben am 13. Juni 1914.

Referate.

Löhnis, F., Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie. 8⁰. VIII. u. 398 p. 10 Taf. u. 60 Textabbild. Berlin (Gebr. Borntraeger) 1913. Preis gebd. 17,50 *M*.

Mit dem vorliegenden Werke hat Löhnis eine vor mehreren Jahren begonnenene großzügige Zusammenfassung des Gesamtgebietes der Agrikulturbakteriologie zu einem vorläufigen Abschlusse gebracht. Eine „Einführung in die Bakteriologie“, ein „Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum“ und das „Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie“ sind den jetzt erschienenen „Vorlesungen“ voraufgegangen, so daß die Bedeutung, Entwicklung, der gegenwärtige Stand und die schwebenden Probleme dieses Zweiges der Landwirtschaftswissenschaft eine lückenlose Darstellung gefunden haben. Nur noch eine „Diagnostik der landwirtschaftlich wichtigen Mikroorganismen“ würde, wie Verf. einleitend bemerkt, eventuell als Schlußstein des ganzen in Angriff zu nehmen sein. „Ohne sehr ausgedehnte experimentelle Arbeit ist aber auf diesem Gebiete nichts Brauchbares zu schaffen, und es ist einstweilen noch sehr zweifelhaft, ob sich die hierfür erforderliche Zeit und Unterstützung finden lassen wird.“ Verf. beklagt es, und jeder Fachgenosse wird hierin mit ihm eines Sinnes sein, daß die landwirtschaftliche Bakteriologie in Deutschland nicht in gleichem Maße gefördert wird wie im Auslande, besonders in England und Amerika, daß sie sich vielmehr, nachdem die übertriebenen Hoffnungen, die man anfänglich auf sie setzte, naturgemäß nicht in Erfüllung gingen, eine kränkende Zurücksetzung gefallen lassen muß, die ihrer Weiterentwicklung störend und hemmend im Wege steht.

Verf. betrachtet die landwirtschaftliche Bakteriologie nicht, wie das zuweilen geschieht, als Teilgebiet der technischen Mykologie, sondern als selbständige Disziplin, die sich mit denjenigen Umsetzungen und Zersetzungen zu beschäftigen hat, welche in den Futtermitteln, in der Milch, in Butter und Käse, im lagernden Stalldünger sowie im Boden entweder dauernd oder zeitweise vonstatten gehen. Innerhalb dieser selbst gezogenen Grenzen gliedert Verf. das vorliegende Werk in einen allgemeinen Teil, der in 14 Vorlesungen das wichtigste über Form, Bau, Entwicklung und Einteilung der Mikroorganismen, über ihre Lebenseigentümlichkeiten, ihre Züchtung, Bekämpfung und ihre Leistungen bringt, und in einen speziellen Teil, der sich in weiteren 11 Vorlesungen mit der Futtermittel- und Molkereibakteriologie, sowie mit der Bakteriologie des Düngers und Bodens beschäftigt.

Wie bei seinen sämtlichen Veröffentlichungen beschränkt sich Löhnis auch hier keineswegs darauf, die bekannten, durch die Forschung sichergestellten Tatsachen mitzuteilen, er behandelt vielmehr den ganzen Stoff unter ständiger Bezugnahme auf seine eigenen Erfahrungen und Auffassungen in stets kritischer, daher auch durchweg anregender und fesselnder Weise. Durch diese Art der Darstellung erfährt das wertvolle und wissenschaftlich begründete Tatsachenmaterial eine scharfe Trennung von den vielen unerwiesenen oder unrichtigen, aber doch dauernd durch die Literatur sich hinziehenden Angaben.

So wendet sich Verf. beispielsweise gegen die immer wieder besonders in der deutschen agrikulturchemischen Literatur auftauchenden Behauptungen, daß bei der Nitrifikation ca. 10 Proz. des Stickstoffs in elementarer Form abgespalten oder von den Salpeterbakterien zum Aufbau ihrer Körpersubstanz verwendet werden. Beide Angaben sind wiederholt als unrichtig erwiesen worden, wir wissen, daß höchstens 1, niemals 10 Proz. des Stickstoffs von den salpeterbildenden Bakterien assimiliert werden, und daß die normale Nitrifikation verlust- und restlos verläuft. Auch die aus der Empfindlichkeit der Salpeterbakterien gegen organische Substanzen und Ammoniak gezogenen weitgehenden, aber entschieden unrichtigen Schlüsse erfahren durch den Verf. die erforderliche Einschränkung und Richtigstellung. Bei Besprechung der Cyanamidspaltung im Boden bemerkt L. mit Recht, daß der Kalkstickstoff unstreitig heute schon weit größeren Anklang gefunden haben würde, wenn durch ausgedehntere Anwendung der Umsetzungsversuche in den Laboratorien der Versuchsstationen die Landwirte besser darüber unterrichtet worden wären, auf welchen Böden das Cyanamid mit Vorteil zu verwenden sei und wo nicht.

Doch es soll nicht weiter auf Einzelheiten des Inhalts eingegangen werden, das würde an dieser Stelle viel zu weit führen. Verf. hat bei der ganzen Ausarbeitung den Vorlesungsstil nach Möglichkeit beibehalten und auch die an die Vorträge sich anschließenden ergänzenden Unterredungen berücksichtigt, es ist dadurch eine einfache und überaus frische Darstellung des gesamten Materiales zustande gekommen, die noch bedeutend gewinnt durch die beigegebenen zahlreichen schönen und instruktiven Abbildungen, welche bis auf vereinzelte Ausnahmen nach Originalen des Verf. hergestellt sind. Die Zellulosezersetzung durch Pilze und Bakterien, die verschiedenen Arten der Ammoniak- und Nitratumsetzung in Nährlösungen, das typische Wachstum der verschiedenen Azotobactervarietäten dürfte wohl noch nie in so vollkommener, charakteristischer Weise dargestellt worden sein, wie in dem vorliegenden Werke.

Daß ein so kritisch und unter ständiger Wahrung und Betonung des persönlichen Standpunktes geschriebenes Buch nicht in allen Einzelheiten die Zustimmung des Lesers finden kann, ist eigentlich selbstverständlich. Es gibt in der landwirtschaftlichen Bakteriologie eine Reihe von Fragen, deren gegenwärtiger Stand es wohl erlaubt, daß die Fachgenossen sich ihre endgültige Lösung in verschiedener Weise vorstellen. Ref. erinnert hier z. B. an die Bewertung des Lösungs- und Erdversuchs bei der sog. Remyschen Untersuchungsmethode. Auch den Wert der von der deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft unterstützten Brachefeldversuche wird wahrscheinlich mancher Leser höher einschätzen als es L. tut. Es sind dies aber nur Differenzen in der persönlichen Auffassung über die Bewertung des einen oder anderen noch nicht völlig klargestellten Problems, die den Wert der ausgezeichneten Darstellung des gesamten Gebietes nicht nur nicht beeinträchtigen, sondern erhöhen.

So schließt sich dieses neue L.sche Werk würdig an das für jeden auf dem Gebiete der landwirtschaftlichen Bakteriologie Tätigen unentbehrlich gewordene Handbuch an. Es wird jedoch seiner Anlage und Durchführung entsprechend für einen noch viel weiteren Kreis wertvoll und nutzbringend werden. Vogel (Bromberg).

Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie. 2. verm. Aufl. 17. Fortsetzung. Jena (G. Fischer) 1905—1913.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Die nach sehr langer Unterbrechung jetzt erschienene 20. Lieferung bringt die Fortsetzung des 16. Kapitels des V. Bandes aus der Feder von Kroemer über die Anwendung von Reinhefen bei Mostgärung; im § 100 wird über dieselbe bei Umgärung von Weinen berichtet und im nächsten Paragraphen dieser Vorgang bei der Schaumweinbereitung besprochen. Hier wird besonders betont, daß einige Hefenarten die das Rütteln und Klären des Weines sehr beschleunigende Eigenart eines raschen „körnigen" Absetzens haben. Offenbar spielt hier die Beschaffenheit der Zellwände durch eine höhere spezifische Schwere gegenüber leichteren Zellen eine Rolle. So soll u. a. am besten sedimentieren die Rasse Schloß Johannisberg II.

Das 17. Kapitel, gleichfalls von **Kroemer,** berichtet über Haupt- und Nachgärung des Weines. Dieses Kapitel bringt für den Oenologen ein außergewöhnliches reiches Material, auf welches hiermit besonders verwiesen sei; beginnend mit dem Einfluß der Mostbestandteile und der Gärprodukte auf Hefenwachstum und Gärung, wird dann die Beeinflussung der Weingärung durch die Temperatur, den Einfluß der Luftzufuhr, des Lichtes, sowie diejenige der Pilzgifte gezeigt. Dann geht Verf. auf die Bildung des Alkohols, des Glyzerins und der Bernsteinsäure über, schildert das Auftreten der flüchtigen Säuren und Aldehyde, sowie die Entstehung höherer Alkohole und der Bouquetstoffe. Hier sei darauf verwiesen, daß seit dem Erscheinen des IV. Bandes (§ 88) über die Entstehung der Fuselöle neue Arbeiten von F. Ehrlich und Pringsheim zeigten, daß nicht, wie früher fast allgemein angenommen, diese im wesentlichen durch eine von Bakterien ausgehende eigenartige Zuckerspaltung die höheren Alkohole des Fuselöls erzeugen, sondern daß dieselben Stoffwechselprodukte der Hefen sind, die beim Eiweißaufbau dieser Pflanzen durch Spaltung der von vornherein im Gärstoffe enthaltenen oder durch Selbstverdauung der Hefe gebildeten Aminostoffe entstehen. Auf den besonders interessanten § 108 sei deshalb verwiesen. Auch die Mitteilungen über die Nachgärung und Säureabbau des Weines, Umgärung und Schaumweinbereitung, Abziehen und Klären desselben, sowie der Ausbau der Weine auf der Flasche und das Sterilisieren bringen die Ergebnisse der neuesten Forschungen. So ist z. B. zu ersehen, daß in 80—100-jährigen Bordeauxweinen ruhende, aber in geeigneten Nährlösungen noch vermehrungs- und gärfähige Hefen, ferner in einigen Fällen auch lebende Kahmpilze, Schimmelsporen und Bakterien aufgefunden wurden. Ebenso wie in diesem Paragraphen gezeigt wurde, daß fertige Weine günstig durch Gärungsorganismen beeinflußt werden können, kann auch das Gegenteil eintreten. Den Schluß bilden Angaben über Pasteurisieren und Sterilisieren der Weine; im allgemeinen haben sich die auf beide Verfahren gesetzten Hoffnungen nicht erfüllt, und am meisten scheint man sich ersterer Methode bei Rotweinen in Frankreich zu bedienen, während beim Versand in die Tropen sterilisiert wird (p. 488—490). Auch Kapitel 18 ist von Kroemer geschrieben; die von Produzenten, aber auch von Konsumenten häufig beobachteten Erscheinungen des Braun- und Schwarzwerdens sind in eingehendster Weise erörtert; ihnen folgen die Angaben über Weintrübungen, Geschmacksänderungen durch Schimmelpilze und der als Böckser bezeichnete faulige Geruch und Geschmack des Weines soll einesteils durch Schwefelwasserstoff hervorgerufen werden, andernteils aber auf Gegenwart flüchtiger Schwefelverbindungen beruhen. Die meisten Autoren bringen diese unangenehmen Erscheinungen mit bakterieller und zwar reduzierender Tätigkeit in Zusammenhang. Die für den Produzenten sehr unangenehmen Prozesse des Kahmigwerdens, der Essig- und Milchsäurestich werden hiernach besprochen. Den Schluß dieses mit größter Sorgfalt bearbeiteten und durch beigefügte, sehr zahlreiche Literaturangaben versehenen Kapitels bilden die neuesten Forschungen über Mannitgärung, Mäuseln und Buttersäurestich, sowie ferner das Zäh- und Bitterwerden und das Umschlagen des Weines. — Wir ersehen hieraus, welchen Schwierigkeiten die Gewinnung eines einwandfreien und haltbaren Weines gegenübersteht und welche Wichtigkeit der bakteriellen und pilzlichen Einwirkung zukommt.

Der VI. Abschnitt bringt die Essigsäuregärung und den Abbau einiger organischen Säuren. Während das 19. Kapitel, die Essigsäuregärung, von Lafar stammt, hat das letzte 20. Kapitel Dr. W. Omelianski zum Verfasser. — Im § 122 beginnt Lafar mit der Essigsäuregärung als Lebensvorgang. Hier begegnen wir zunächst denjenigen Forschern, deren Namen für immer mit der Erkennung des Vorgangs der Essigsäurebildung verknüpft sind, und so seien u. a. nur Schwann, Th. Kützing, Cagniard-Latour und Pasteur angeführt; aber auch H. Boerhave muß noch hervorgehoben werden, welcher bereits 1732 die Gärung als eine Art Vegetationsprozeß aufgefaßt zu haben scheint, und Pasteur war es dann zuerst, welcher sie als Wirkung der Tätigkeit bestimmter Kleinlebewesen aufs neue ansah und hierfür die Beweise erbrachte. Im § 123 folgt die Systematik der Essigsäurebakterien, denen sich die Bier-, Wein- und Schnellessigbakterien anschlossen. Viele hochwichtige Angaben sind im § 126 — die Schleimessigbakterien und der Schleimfluß der Bäume enthalten. Die letzteren und die als Essigfluß bezeichneten Abarten an den Eichen insbesondere wirken in der freien Natur als Brutstätten für die Essigsäurebakterien. Dem Chemismus der Essigsäuregärung schließen sich die Abhandlung über die Säurebildung aus einwertigen Alkoholen, die Oxydation mehrwertiger Alkohole und die Bildung von Säuren aus Kohlenhydraten an. Hier findet sich auf p. 584 eine sehr interessante Zusammenstellung über die verschiedenartige bakterielle Tätigkeit bei diesem Vorgange, wobei 31 Mikroorganismenarten beobachtet wurden; auf p. 588 wird speziell die Oxalsäurebildung besprochen. Die nächsten Paragraphen bringen den Einfluß anorganischer Gifte, des Lichtes und des Verhaltens zu organischen Giften. Der nach der Stadt gleichen Namens benannte Reinzuchtbetrieb im Orleans-Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß hier durch eine jegliche Erschütterung vermeidende Art der Vermehrung der Essigsäurebakterien sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit eine Hautdecke bildet. die nicht durch allfällige Zerreißung untersinken darf, um so dem Luftsauerstoff entzogen zu werden. In der Umgebung von Orleans ist diese Erzeugungsart allgemein und das Produkt sehr geschätzt. Eingehend sind hier die Mykodermen und die Essigbakterien besprochen und dann Angaben über die Lebensdauer der Reinzuchten gebracht. Ein unbestreitbarer Vorteil des Reinzuchtverfahrens besteht im Fernhalten der Anguillula aceti (Essigälchen). Im § 134 werden die biologischen Verhältnisse im Bildner beim deutschen Verfahren niedergelegt. Hier wird uns in der geschichtlichen Entwicklung des Prozesses ein klares Bild gezeigt, und wir finden hochwichtige Einzelheiten, die zur erreichten Stufe unserer heutigen Kenntnisse führen; auch an dieser Stelle wird die Wichtigkeit der Reinkulturen betont. Im § 135 — die Essigarten — ist neben deren einzelnen Schilderung auch der Analyse des Essigs eingehende Bearbeitung zuteil geworden und die Kostprobe durch Essigkenner als nicht mehr verläßlich bezeichnet, da die Fälscher durch geschickte Zusätze von Estern die Produkte parfümieren und zu Täuschungen Veranlassung geben. Den Schluß dieses äußerst sorgfältig bearbeiteten Kapitels bilden im § 136 die Essigsäurebakterien als Schädlinge in den Gärungsbetrieben; in Betracht kommen hier die Schädigungen bei den verschiedenen Bierarten, auch bei Sacké (japanische Arbeiten), ferner in der Rumbrennerei und der Weinbereitung. In den Limonaden des Handels sind dagegen bis jetzt noch keine Essigsäurebakterien gefunden, ebensowenig in Sojasauce. Sehr wichtig ist die Essigsäure im Molkereibetriebe, wenn auch hier nicht von der echten Essigsäuregärung gesprochen werden kann, sondern solche als ein Nebenprodukt aus der großen Menge von Milchsäurebakterien auftritt; bekanntlich bildet z. B. Bact. lactis aërogenes aus Milchzucker reichlich Essigsäure. — Die aus sanitären Gründen in letzter Zeit viel genannten Sauermilcharten, wie Yoghurt, Gioddu u. a. sind sehr eingehend in dieser Hinsicht besprochen (p. 625—626). — Fast acht Seiten Literaturangaben schließen dieses äußerst lehrreiche Kapitel ab.

Der Anfang des die letzten Seiten der vorliegenden Lieferung bildenden 20. Schlußkapitels wird nach Erscheinen der letzten Lieferung mit besprochen werden. Rullmann (München).

Ehrlich, Felix, Über einige chemische Reaktionen der Mikroorganismen und ihre Bedeutung für chemische und biologische Probleme. (Vortrag, geh. auf d. VIII. internat. Kongreß f. angew. Chem. in New York am 9./9. 1912; Mitt. d. landw. Inst. Breslau. Bd. 6. p. 705—713.)

Verf. bespricht nach einem Rückblick auf seine Untersuchungen über die chemischen Umwandlungen von Aminosäuren durch Hefen und Schimmelpilze die Ergebnisse seiner Studien über die Einwirkung dieser Mikroorganismen auf primäre und tertiäre Amine, sowie auf einige ringförmige N-Verbindungen. Die primären Amine werden von wilden Hefen und vielen Schimmelpilzen fast quantitativ, weniger leicht dagegen von Kulturhefen, analog den Aminosäuren in Alkohole übergeführt, wobei, von den Kulturhefen abgesehen, statt Zucker auch Glyzerin, Äthylalkohol usw. als Kohlenstoffmaterial dienen können.

Tertiäre Amine (Hordenin, Betain) erwiesen sich als vorzügliches N-Nährmaterial für eine ganze Reihe von Mikroorganismen. Näher verfolgt wurde der Abbau, den die tertiären Amine durch das Wachstum der Heferasse Willia anomala erleiden. Hierbei zeigte sich merkwürdigerweise, daß auch in diesen Fällen eine Ersetzung der Amingruppe durch die Hydroxylgruppe stattfindet, und daß bei der Assimilation von Hordenin fast quantitativ Tyrosol, bei derjenigen von Betain deutlich nachweisbar Glykolsäure auftritt.

Auf Lösungen von Pyridinphosphat, Piperidintartrat, Cinchoninsäure usw. entwickelten sich die geprüften Pilze sehr gut. Besonders überraschend war, daß auch eine ganze Reihe von Alkaloiden eine geeignete N-Quelle für die gleichen Hefen und Pilze darstellten. Bestimmte Stoffwechselprodukte sind hierbei bisher noch nicht isoliert worden, es wird dies aber ohne Zweifel gelingen, und damit dürfte dann die Konstitution mancher chemisch noch unbekannter Alkaloide ihre Aufklärung finden.

Verf. hält es für wünschenswert, daß die verschiedenen chemischen

Reaktionen, deren die Mikroorganismen fähig sind, mehr als bisher zur Erforschung organisch chemischer Probleme herangezogen werden. „In dieser Hinsicht dürfte namentlich die Eindeutigkeit interessant erscheinen, mit der in ganz heterogen zusammengesetzten organischen N-Verbindungen, wie primären, tertiären Aminen, Aminosäuren usw. durch sehr viele Arten von Mikroorganismen regelmäßig und in zahlreichen Fällen fast quantitativ ein Ersatz des Stickstoffs durch die Hydroxylgruppe erfolgt.“

Vogel (Bromberg).

Zikes, Heinrich, Ein Beitrag zur Enzymbildung und deren Ursachen. (Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Bd. 40. 1912. No. 49.)

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Erzeugung der Enzyme nicht immer eine typische Eigentümlichkeit der Mikroorganismen ist, sondern daß sie oft eng mit der Art der Ernährung zusammenhängt und von derselben abhängig erscheint. Nur Hefen machen in der Bildung von kohlehydratspaltenden Enzymen eine Ausnahme; sie zeigen eine große Konstanz und ist durch eine Reihe von Arbeiten nachgewiesen worden, daß eine bestimmte Hefeart durch eine besondere Züchtung nicht dazu gebracht werden kann, eine neue Zuckerart zu vergären, welche sie nicht schon früher bei entsprechender Ernährung vergären konnte, nur Galaktose scheint eine Ausnahme zu bilden, wie aus Arbeiten von Slator, Harden und Norris, Euler und Johansson hervorgeht. Auch ist es bisher, wie aus einzelnen Arbeiten zu entnehmen ist, nicht möglich gewesen, bei Hefen durch irgendeine abnormale Ernährung die Produktion eines bestimmten Enzyms zu unterdrücken, welches sie früher besessen hatten.

Verf. züchtete eine Saazhefe, welche Saccharose vergären konnte, durch 14 Jahre in reinen Glukoselösungen. Als dieselbe nach 3—400-facher Umzüchtung in verschiedenen Lösungen dieses Kohlehydrates (Stickstoffquelle teils Asparagin, teils Ammonsulfat) wieder in Saccharoselösungen gebracht wurde, wies dieselbe selbst bei den ersten Generationen ein kräftiges Gärvermögen für diesen Zucker auf. Dasselbe trat ein, als die Versuche mit frisch abgetöteten Zellen aus den Glukoselösungen wiederholt wurden.

Aus letzterer Beobachtung geht hervor, daß es nicht einmal zu einer Anreizung der Invertasebildung zu kommen braucht, sondern daß die Hefe vor ihrer Abtötung das Enzym in entsprechender Menge und im Zustand eines präexistierenden Zymogens enthalten haben muß, sonst wäre bei dem Zusammenbringen der abgetöteten Glukosehefe mit der Saccharoselösung die Spaltung und Vergärung des Zuckers nicht beobachtet worden. Die gleichen Versuche wurden auch in entsprechend zusammengesetzten Maltoselösungen ausgeführt, und auch hier zeigte sich das gleiche Resultat. Die Hefe enthielt also nicht allein Invertase, sondern auch Maltase in Form eines Zymogens trotz der viele Jahre andauernden Züchtungen in Glukoselösungen.

Autoreferat.

Grimmer, W., Beiträge zur Kenntnis der Fermente der Milchdrüse und der Milch. [Habilitationsschr.] (Biochem. Zeitschr. Bd. 53. 1913. p. 429.)

Die Untersuchungen Grimmers bezweckten einmal festzustellen, welche Fermente der Milch originären Ursprungs seien, andererseits sollte untersucht werden, welche Funktionen die laktierende Milchdrüse gegenüber der nichtmilchenden ausübt. Es wurden daher von milchenden und nichtmilchenden Drüsen von Rind, Schaf, Schwein und Pferd Preßsäfte und Kochsalzextrakte hergestellt und weiterhin Drüsen der genannten Tiere der Autogestion unterworfen. Es ergab sich, daß alle untersuchten Drüsen proteolytische Fermente enthalten, die anscheinend spezifischer Natur sind, da den Extrakten zugefügte Eiweißkörper — Fibrin, Gelatine, Hühnereiweiß — nicht verdaut wurden, während andererseits bei der Autodigestion eine weitgehende Autolyse stattfand. Der Abbau erfolgte bis zu Aminosäuren. Ein typischer Unterschied zwischen laktierenden und nichtmilchenden Drüsen bestand darin, daß in den ersteren der Abbau weitaus intensiver verlief als in den letzteren und daß unter den Abbauprodukten der Eiweißkörper der milchenden Drüsen ständig Tryptophon auftrat, welches in den Autolysaten der nichtmilchenden Drüsen regelmäßig fehlte. Ob die Eigenschaft aller Drüsenextrakte und -preßsäfte, aus Seidenpepton Tyrosin abzuspalten, auf der Anwesenheit eines besonderen peptolytischen Fermentes beruht, oder ob dies die Wirkung lediglich eines proteolytischen Fermentes ist, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Verf. hält es für wahrscheinlich, daß die Tryptophanabspaltung auf der Wirkung eines besonderen, nur den milchenden Drüsen eigentümlichen und vielleicht peptolytischen Fermentes beruht, während die Tyrosinabspaltung, die bei allen Drüsenextrakten erfolgte, nur dem proteolytischen Fermente zuzuschreiben wäre. Alle untersuchten Drüsen enthielten ein Monobutyrin und ein Salol spaltendes Agens. Die Fermentnatur des letzteren wurde bewiesen. Die Salolase war nicht dialysierbar, behielt ihre Wirkung nach Beseitigung der alkalischen Reaktion durch Dialyse in vollem Umfange bei und wurde durch Erhitzen zerstört. In den Drüsen wurde weiterhin eine Amylase vorgefunden, die jedoch in wechselnden Mengen auftrat und beim Schafe keine nennenswerte Wirkung entfaltete. In den ruhenden Drüsen des Rindes war anscheinend mehr Amylase enthalten als in den milchenden. Eine Guajakperoxydase wurde lediglich in den laktierenden Drüsen von Rind und Schaf gefunden. Die ruhenden Drüsen dieser Tiere, sowie die Drüsen von Pferd und Schwein, und die Milch von Hund und Schwein enthalten keine Guajakperoxydase. In den genannten Milcharten findet sich nur eine Paraphenylendiaminperoxydase, ob sie auch in den untersuchten Drüsen enthalten ist, konnte einwandfrei nicht festgestellt werden, da Blut die gleiche Reaktion gibt. Verf. mißt den in der Milch auftretenden Fermenten keine Bedeutung für die Säuglingsernährung bei, sondern betrachtet sie lediglich als Produkte der Milchdrüse, die nötig waren zur Milchbildung. Autoreferat.

Zaleski, W., Über die Verbreitung der Karboxylase in den Pflanzen. (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. 1913. p. 349—353.)

Verf. konnte die von Neuberg in der Hefe entdeckte Karboxylase, die Brenztraubensäure in Acetaldehyd und Kohlensäure spaltet, in den Samen von Erbse, Lupinus, Vicia Faba, Weizen, Mais, dem Mycel von Aspergillus niger, in etiolierten Keimpflanzen von Weizen und Vicia Faba nachweisen. Die Spaltung tritt bei lebenden und gepulverten und mit Sublimat sterilisierten Objekten ein. Als Maß der Spaltungsintensität diente quantitative Bestimmung der abgespaltenen CO_2; Acetaldehyd wurde qualitativ in den Versuchsproben nachgewiesen. Die Versuche mit lebenden Objekten dauerten höchstens bis zu 2½ Stunden, um die Tätigkeit von Mikroorganismen möglichst auszuschalten. Intensiver als die Brenztraubensäure werden die alkalischen Salze zersetzt. Das Fer-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ment ist hauptsächlich anaërob, wirkt aber in vielen Fällen auch bei Gegenwart von O. Etiolierte Stengelspitzen von Vicia Faba zersetzten in Luft nicht, dagegen energisch im Vakuum. Nach Auszug mit Methylalkohol zersetzen sie auch in der Luft, vielleicht infolge der Extraktion von Stoffen, deren Oxydationsprodukte die Tätigkeit der Karboxylase hemmen. Der auftretende Acetaldehyd wird zu Alkohol reduziert oder weiter oxydiert.

Rippel (Augustenberg).

Beijerinck, M. W., Over de samestelling der tyrosinase uit twee enzymen. (Versl. kon. Akad. v. Wet. 1913. p. 923—930.)

Es wurde die Bildung eines Melanins aus Tyrosin durch die Symbiose von Bacterium sp. und Actinomyces sp. beobachtet. Beide Pilzarten leben in der Gartenerde. Actinomyces spaltet Tyrosin und bildet ein farbloses Chromogen, das Bacterium aber bildet aus letzterem Melanin. Das Chromogen ist wahrscheinlich Homogentisinsäure. Da die Chromogenbildung durch Tyrosinase, die Melaninbildung durch eine Oxydase (vielleicht Laktase) verursacht wird, so hat man es mit zwei enzymatischen Prozessen zu tun. — Da manchmal der Milchsaft von Euphorbia lathyris und andere Präparate von Tyrosinase aus Phanerogamen auch die oben erwähnte Säure oxydieren, so muß man wohl mit Recht diese Tyrosinase als ein Gemisch von zwei oxydierenden Enzymen ansehen.

Matouschek (Wien).

Zaleski, W., Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenatmung. [Vorläuf. Mitteil.] (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. 1913. p. 354—361.)

Getrocknete und gepulverte Proben der im vorstehenden Referat aufgeführten Objekte zeigten mit Ausnahme der etiolierten Keimpflanzen von Vicia Faba bei Zusatz von Hefanolextrakt bedeutende Steigerung der CO_2-Produktion im Vergleich zu mit destilliertem Wasser behandelten Objekten; die Produktion war in Luft und im Vakuum gleich groß, es wird also nur die anaërobe Atmung stimuliert. Das Verhalten der etiolierten Stengelspitzen von Vicia zeigt auffallende Ähnlichkeit mit dem Verhalten derselben Substanz bei der Spaltung der Brenztraubensäure (siehe vorst. Ref.), doch konnte diese im Hefanolextrakt (als ev. Zwischenprodukt der Zuckergärung) nicht nachgewiesen werden, ebensowenig wie Acetaldehyd in den Versuchsproben. Die die CO_2-Produktion stimulierende Substanz ist aus Hefanol mit Methylalkohol zu extrahieren und löslich in 50-proz. Aceton, was dafür spricht, daß nicht die in 50-proz. Aceton unlösliche Zuckerphosphorsäure der stimulierende Faktor ist, wie Iwanoff annimmt. Auf die Frage nach der Natur des stimulierenden Stoffes gedenkt Verf. später zurückzukommen.

Bezüglich der beiden vorstehenden Referate möchte Ref. darauf hinweisen, daß von den Tabellen u. a. diejenigen, welche die erhöhte CO_2-Produktion der etiolierten Stengelspitzen von Vicia im Vakuum zeigen sollen, in beiden Arbeiten das Gegenteil aussagen wie die Schlüsse des Verf. Es scheint eine mißverständliche und übersehene Vertauschung mehrerer Versuchsergebnisse vorgekommen zu sein. Rippel (Augustenberg).

Kostytschew, S., Brillant, W. u. Scheloumoff, Über die Atmung lebender und getöteter Weizenkeime. (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. 1913. p. 432—441.)

Die Resultate sind folgende: Hemmung von Luftzutritt bewirkt Herab-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

setzung der Sauerstoffaufnahme bei lebenden und toten Weizenkeimen; sekundäre Phosphate üben keinerlei Wirkung auf CO_2-Produktion oder O_2-Aufnahme lebender oder toter Weizenkeime aus; vergorene Zuckerlösung steigert die CO_2-Produktion und O_2-Aufnahme lebender Weizenkeime; bei toten Weizenkeimen wird auch bei guter Durchlüftung nur die CO_2-Produktion gesteigert. Rippel (Augustenberg).

Palladin, W. u. Lvoff, S., Über die Einwirkung der Atmungschromogene auf die alkoholische Gärung. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. II. p. 326—337.)

Ziel der Arbeit war, die Wirkung der durch Atmungschromogene hervorgerufenen Prozesse auf die Zymase festzustellen. Die Versuche wurden mit Hefe ausgeführt, welche nach der Methode von Lebedew abgetötet worden war. Diese Hefe wurde in Rüben- oder Champignonsaft, welcher mit Saccharose versetzt war, eingetragen. Die entwickelte CO_2-Menge wurde mit Barytlauge und der Alkohol durch Gefrierpunkterniedrigung seiner Lösungen gemessen. Zu den Versuchen wurde sowohl ungekochter als auch gekochter Saft verwendet und mit einem Luft- bzw. Wasserstoffstrom behandelt. Aus der ersten und zweiten Versuchsreihe ergab sich, daß die Chromogene des Rübensaftes zu schwarzem Pigment oxydiert werden, wobei die alkoholische Gärung stark gehemmt wird. In einem dritten Versuch wurde ermittelt, daß der Sauerstoff auf die Selbstgärung des Stoffes eine schädliche Wirkung ausübt. In der vierten Versuchsreihe wurden in einem Versuch erst nach Oxydation des Saftes Saccharose und Hefe zugefügt. Im Wasserstoffstrom blieb die helle Färbung des Saftes fast unverändert. Beim Durchströmen von Luft blieben die Säfte während der Hauptgärung mehr oder weniger hell, mit Abnahme der Gärung wurden die Säfte rasch schwarz. Ähnliche Resultate ergab ein Versuch mit Champignonsaft.

Aus diesen Versuchen ziehen die Verff. folgende Schlüsse:

1. Die Vergärung des aus Pflanzen ausgepreßten Saftes mit abgetöteter Hefe im Luftstrom ist von einer Oxydation des im Saft enthaltenen Atmungschromogens zu Pigment begleitet, welche die Arbeit der Zymase stark beeinträchtigt. Dies tritt dann besonders in die Erscheinung, wenn der Saft vor Zugabe der Hefe oxydiert wird.

2. Im abgekochten Saft, welcher nicht mehr imstande ist, Prochromogen in Chromogen überzuführen und zu Pigment zu oxydieren, geht eine energische alkoholische Gärung vor sich.

3. Wird die Oxydation des Chromogens im ungekochten Saft durch Durchleiten von Wasserstoff verhindert, so ist hier Hemmung der alkoholischen Gärung zu beobachten. Chromogen und Peroxydase üben demnach nur bei Gegenwart von Sauerstoff (also bei Oxydation) schädlichen Einfluß auf die Gärung aus. Die Hemmung der Gärung durch die Oxydation der Atmungschromogene macht sich in gleicher Weise bei der Kohlensäure und dem Alkohol bemerkbar und man kann sich den Vorgang derart erklären, daß die Pigmente den während der Bildung der Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung entstehenden Wasserstoff an sich nehmen und denselben mit dem Luftsauerstoff zu Wasser oxydieren.

4. Die Hemmung der Gärung ist in vielen Fällen nicht nur von der Wasserstoffentnahme, sondern auch noch von der Beseitigung einiger Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung abhängig.

5. Auch die Produkte der Autolyse des Saftes können, selbst bei Abwesenheit von Sauerstoff, schädlichen Einfluß auf die Gärung ausüben.

6. Versuche über Alkoholbildung in abgetöteten grünen Pflanzen ergaben, daß manche Pflanzen (chromogenarme wie Erbsensamen) große Mengen Alkohol (bei gleichen Mengen Kohlensäure) und andere chromogenreiche Pflanzen reichlich Kohlensäure und keinen oder nur wenig Alkohol ausscheiden. So geben die chromogenreichen Blüten der Pappeln (lebend) in wasserstoffreier Atmosphäre keine typische alkoholische Gärung, sondern scheiden neben Alkohol noch beträchtliche Mengen Acetaldehyd aus, weil die Chromogene die Reduktion des Aldehyds zu Alkohol verhindern.

7. Für die Praxis des Gärungsgewerbes ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit der Fingerzeig, daß nicht nur die Hefe, sondern auch die Beschaffenheit des Materials (also die dem Saft eigenen Fermente) von Einfluß auf Alkoholmenge und Bildung von Nebenprodukten (Farbe, Aroma, Geschmack) sind. Bischkopff (Berlin).

Zaleski, W., Bemerkungen zu Kostytschews Mitteilungen über die Atmung der Weizenkeime. (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. 1914. p. 87—90.)

Verf. weist die Behauptung Kostytschews zurück, wonach seine (Zaleskis) Versuche über die Atmung der Weizenkeime bei mangelhafter Äration ausgeführt seien.

Weiter hält Verf. die Annahme Kostytschews, daß bei abgetöteten Weizenkeimen „etwa die Hälfte der gebildeten CO_2 im Vorgange der alkoholischen Gärung erzeugen, während die andere Hälfte auf die Sauerstoffatmung zurückzuführen“ sei, nicht für erwiesen, wofür einige allgemeine Gründe angeführt werden. Rippel (Augustenberg).

Henneberg, W. u. Bode, G., Die Gärungsgewerbe und ihre naturwissenschaftlichen Grundlagen. (Wissenschaft u. Bildung. No. 110.) 16°. 128 pp. Leipzig (Quelle u. Meyer) 1913.

Eine sehr gut durchgeführte, populär gehaltene Darstellung der Gärungsvorgänge und ihrer Erreger nebst praktischer Verwertung dieser. Eigenartig mutet den Leser die Definition von Bakteriologie als der Lehre von Spaltpilzen, Hefepilzen und Schimmelpilzen, oder die Bezeichnung der Coccidien- und Sporangienträger der „Schimmelpilze“ als Fruchtkörper an. Solche Unrichtigkeiten könnten bei einer Neuauflage des Werkes, die ja bald ob seiner Vorzüge erfolgen dürfte, leicht vermieden werden.

Matouschek (Wien).

Paris, G., Contributo sperimentale allo studio dei Saccaromiceti. (Staz. sperim. agrar. 46. 1913. p. 196—218. Mit 2 Taf.)

Verf. bespricht die angewandten Züchtungs- und Beobachtungsmethoden, die sich mit den wohlbekannten ganz und gar decken; die Beschreibung der Eigenschaften der aus der Provinz Avellino reingezüchteten Weinhefen wird in einer späteren Mitteilung folgen. Pantanelli (Neapel).

Rubner, Über Hefeforschung. (Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranst. f. Brauerei. Jg. 16. p. 224—241.)

Verf. bringt eine Übersicht über den Inhalt seiner auf diesem Gebiet veröffentlichten Arbeiten. Rommel (Berlin).

Zikes, Heinrich, Einige orientierende Versuche über die Thermogenität verschiedener Hefen in Glukosewürze. (Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. Bd. 41. 1913. No. 11.)

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt: Die verwendeten Hefen wurden einige Male in 5-proz. Glukosewürze umgeimpft, dann in das Gärgefäß gebracht. Als solches diente ein gewöhnliches Pulverglas von 1 Liter Inhalt, welches für jeden Versuch mit 300 ccm 5-proz. Glukosewürze beschickt und sterilisiert wurde.

Dieses Gefäß wurde jedesmal in eine entsprechend große Holzkiste, deren Boden mit Korkpulver überdeckt war, eingesetzt und auf allen Seiten fast bis zum oberen Rand mit Korkpulver möglichst gut isoliert. Dieselbe befand sich in einer größeren Kiste und war hier gleichfalls bis zum oberen Rand in Korkpulver eingebettet. Als Abschluß des Korkpulvers in beiden Kisten dienten gut abgedichtete Pappendeckelplatten. Der ganze Apparat wurde jedesmal, bevor die Hefe zugesetzt wurde, 48 Stunden in einen Thermostaten gestellt, um ihn auf die Untersuchungstemperatur von 25° zu bringen. Der Apparat wurde, bevor die einzelnen frisch regenerierten Hefekulturen in die Würze gelangten, aus dem Thermostaten genommen, der Wattepfropf oben abgebrannt, die Flasche geöffnet und der Kulturinhalt zweier Freudenreichkölbchen möglichst rasch in die Flasche entleert. Hierauf wurde ein genaues in $^1/_{10}{}^0$ geteiltes Thermometer in die Flüssigkeit eingesenkt und der Apparat, nach entsprechendem Verschluß, in den Thermostaten zurückgebracht. Ein zweites, gleichfalls in $^1/_{10}{}^0$ geteiltes Thermometer gab genau die Temperatur des Thermostatenraumes an.

Die Versuche ergaben, daß die stärker gärenden Hefen, wie Saccharomyces Logos, thermantitonum, Preßhefe und Schizosaccharomyces Pombe usw. eine Temperatursteigerung von über $20^0/_{10}$ herbeiführen konnten. Die gewöhnliche Bierhefe vom Typus Frohberg ergab eine Temperatursteigerung von $17^0/_{10}$, sie produziert mehr Wärme als eine Hefe vom Typus Saaz. Saccharomyces pastorianus, intermedius, validus, ellipsoideus wiesen so ziemlich die gleiche Höhe in der Wärmebildung auf, $17—19^0/_{10}$. Die Gruppe der Hansenia- und Torulahefen, welche nur Monosaccharide vergären, erzeugten Temperaturerhöhungen von $6—8^0/_{10}$; Pichia membranaefaciens, Mycoderma cerevisiae und rubra, Kahmhefen, welche selbst Monosaccharide nicht vergären können, vermochten trotz üppigster Vermehrung gar keine Temperaturerhöhungen herbeizuführen. Autoreferat.

Ehrlich, Felix, Neuere Untersuchungen über die Vorgänge beim Eiweißstoffwechsel der Hefe- und Schimmelpilze. Auszug aus einem auf der 26. Hauptversammlung des Vereins Deutscher Chemiker in Breslau (15.—18. Sept. 1913) gehaltenen Vortrage. (Österreich. Chemikerzeitg. 16. 1. Dez. 1913. No. 23. p. 323.)

Wie wird von der Hefe aus den verschiedenen Aminosäuren das charakteristische Hefeeiweiß aufgebaut? Würden diese Säuren einfach zum Körpereiweiß der Hefezelle addiert werden, so würde dies zu unmöglichen Konsequenzen führen. Das Körpereiweiß würde dann eine schwankende Konstitution besitzen, was aber nach Emil Fischer und Abderhalden nicht der Fall ist. Brachte Verf. Isoleucin (in der Melasseschlempe festgestellt) mit Hefe in einer Zuckerlösung zusammen, so erhält man hieraus die entsprechenden Amylalkohole (Fuselöle). Die Hefe spaltet also die Aminosäure derart, daß sie die Aminogruppe durch die Hydroxylgruppe ersetzt. Es entsteht also auf diese Art der der Aminosäure entsprechende Alkohol, der in der Lösung verbleibt, während der Stickstoff von der Hefe zum Aufbau des Körpereiweißes Verwendung findet.

Zur Bildung des Kohlenstoffskelettes ihres Körpereiweißes benutzt die Hefe den Zucker. An Stelle der einfachen Aminosäuren verwendete Verf. auch Dikarbonsäuren (Glutaminsäure). Diese Säuren werden in die entsprechenden Oxysäuren verwandelt. Aus Phenylalanin wurde Phenyläthylalkohol gewonnen, ein Öl, das den Hauptbestandteil des Rosenöls darstellt; aus dem Tyrosin wurde der entsprechende Alkohol erhalten, den der Vortragende als Tyrosol benannte. Aus Tryptophan wurde Tryptophol gewonnen. Versuche mit Tyrosin ergaben, daß die Quelle der bei der Gärung auftretenden Bernsteinsäure die Glutaminsäure ist. — Doch auch andere Körper als die Aminosäuren können mit der Hefe oder mit Schimmelpilzen verarbeitet werden, z. B. Anilin oder Alkaloide. Die Versuche werden fortgesetzt.

Matouschek (Wien).

Bokorny, Fr., Bindungsvermögen lebender Hefe für Ammoniak, geringe Beteiligung wasserlöslicher Säuren. (Allg. Brauer- u. Hopfenzeitg. 54. 1914. p. 97.)

Aus den Versuchen des Verf. geht hervor, daß das Protoplasma der Hefe imstande ist, Ammoniak zu binden. 20 g frische Preßhefe (Brauereihefe) binden, wenn sie mit 100 ccm Normalammoniak zusammengerieben und 24 Stunden stehen gelassen werden, unter Berücksichtigung der nötigen Korrektur für Verdünnung durch das Hefeorganisationswasser, 0,735 g NH_3. Durch lösliche Säuren in 20 g Hefe wurden 0,102 g NH_3 gebunden. Durch Kochen wird so viel Säure verflüchtigt, daß nur 0,051 g NH_3-Bindung auf die wasserlöslichen Säuren in 20 g Preßhefe entfällt. Auf Bindung durch das Hefeprotoplasma sind somit 0,633 g NH_3 zu rechnen.

H. Will (München).

Grafe, V. u. Vouk, V., Das Verhalten einiger Saccharomyceten (Hefen) zu Inulin. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. III. p. 326—333.)

Verff. fanden, daß sich verschiedene Hefen dem Inulin gegenüber sehr verschieden verhalten, indem manche Rassen Inulin schlecht oder nicht vergären, aber assimilieren und dabei üppiges Wachstum zeigen, andere hinwieder das Inulin vergären und schlechte Entwicklung aufweisen. Nach den zahlreichen Versuchen ist anzunehmen, daß die Vergärung und der Verbrauch von Inulin ein komplizierter Prozeß ist, bei dem außer dem Inulin auch das ganze Gärmedium eine wichtige Rolle spielt. In reinen Inulinlösungen wird·Inulin kaum verbraucht, in natürlichen Pflanzenextrakten (Zichoriensaft), welche auch Lävulose enthalten, bewirken die meisten Heferassen eine erhebliche Verarbeitung des Inulins. Bischkopff (Berlin.)

Kluyver, A. J., Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen. (Biochem. Zeitschr. Bd. 52. p. 486—493.)

Verf. prüfte in seiner Arbeit die Angaben Lindners, Saitos und Roses nach, wonach Maltose gern, Fruktose und Glukose im allgemeinen nur mäßig assimiliert werden. Die genannten Autoren resumieren allgemein, daß eine Zuckerart kräftig assimiliert, aber nicht vergoren wird, sei häufig, der umgekehrte Fall sei seltener. Kl. beanstandet auf Grund der Palladinschen und Abderhaldenschen Ansichten die Deutung der genannten Autoren. Kl. wiederholte die Versuche von Lindner und Saito unter genau denselben Bedingungen und kam dabei zu denselben Resultaten. Die Hefenernte stellte er gewichtsanalytisch fest. Eine zweite Versuchsreihe, in welcher zu der Haydukschen Nährlösung noch Pepton gegeben war, ergab dieselben Resultate. Auf Grund der Bertrandschen Arbeiten über den Einfluß sehr kleiner Mengen bestimmter Stoffe in den Zucker auf Grad und Art der Entwicklung der Organismen, reinigte Kl. die Kahlbaumsche Maltose (von allen erwähnten Autoren verwandt) noch eingehender und fand, daß die verwendete Maltose noch 0,22 Proz. Eiweiß enthielt. Die von Eiweiß befreite Maltose zeigte nun praktisch keine Überlegenheit mehr über die Glukose. In Hefenwasser allein erhielt Verf. höchstens ein spärliches Wachstum gegenüber Glukose-Hefewasser, wo eine üppige Vermehrung beobachtet wurde. Nach seinen Versuchen ist Asparagin nicht geeignet, als einzige Stickstoffquelle zu fungieren. Alles in allem zieht Verf. aus seinen Untersuchungen den Schluß, daß die Ansicht, gärfähige Zuckerarten seien zur Assimilation nicht geeignet, und umgekehrt, nicht aufrechterhalten werden könne.

Bischkopff (Berlin).

Kostytschew, S. u. Scheloumoff, A., Über Alkoholbildung durch Weizenkeime. (Ber. d. Deutsch. bot. Gesellsch. 1913. p. 422—431.)

Gut durchlüftete lebende Weizenkeime produzierten keinen Alkohol, selbst bei Toluolzusatz nur innerhalb der Fehlergrenze liegende Spuren. Bei verhindertem Luftzutritt wird Alkohol gebildet. Luft-(Sauerstoff-)Zutritt kann durch einfaches Befeuchten sehr herabgesetzt werden; in dieser Hinsicht ist bei Arbeiten über Pflanzenatmung Vorsicht geboten. Abgetötete Weizenkeime produzieren auch bei reichlicher Durchlüftung ziemlich Alkohol, etwa die Hälfte der gebildeten Kohlensäuremenge.

Rippel (Augustenberg).

Lundberg, J., Einwirkung des Cyklamins auf die alkoholische Gärung. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. II. p. 223—245.)

Mit dem Studium der Einwirkung des Cyklamins auf Hefe und Gärung wählte L. einen Körper aus der Gruppe der Saponine, eine für das Gärungsgewerbe besonders wichtige Körpergruppe. Die Untersuchung erstreckte sich demgemäß auch auf Wachstum, Vermehrung, Zusammensetzung und fermentative Tätigkeit der Hefe. Verf. prüfte den Einfluß von Cyklamin in verschiedenen Dosierungen auf gärende Hefe, wie auch auf Hefe bei Abwesenheit von Zucker. Des weiteren prüfte er die Giftwirkung in ihrer Abhängigkeit von der Hefemenge. In einer besonderen Versuchsreihe wurde der Einfluß von Cyklamin auf Trockenhefe festgestellt. Die Resultate der zahlreichen, durch Kurven für den Gärverlauf belegten Versuche faßt Verfasser in folgende Sätze zusammen: Durch Behandlung von Hefe mit reiner Cyklaminlösung wird die Gärfähigkeit nicht beeinflußt. Die Gärtätigkeit der Hefe in zuckerhaltigen Lösungen wird durch Cyklamin stark herabgesetzt. Die zur Vergiftung nötige Menge Cyklamin ist der Hefenmenge proportional. Oberhalb einer gewissen Cyklaminkonzentration ruft ein weiterer Giftzusatz keine Beschleunigung der Vergiftung hervor. Die Einwirkung des Cyklamins auf Trockenhefe bezieht sich nicht auf die Menge Trockensubstanz, sondern nur auf die aktive Hefe.

Bischkopff (Berlin).

Lvoff, S., Hefegärung und Wasserstoff. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. III. p. 289—320.)

Diese Arbeit steht in engstem Zusammenhang mit der oben referierten von Palladin und Lvoff, und bildet in gewissem Sinne die Fortsetzung derselben. Während die beiden erwähnten Autoren in der ersten Arbeit nachweisen, daß die Hefe gewisse Fermente enthält, welche unter gewissen Umständen eine reduzierende Wirkung ausüben und dieses an dem Verhalten des Chromogens verschiedener Fruchtsäfte nachwiesen, unternimmt es Lvoff, diesen Reduktionsvorgang weiter aufzuklären und geht dazu von der bekannten Erscheinung aus, daß Methylenblau durch Hefe entfärbt wird, das heißt, durch Reduktion in eine Leukoverbindung übergeführt wird. In Analogie mit den Theorien der Farbstoffchemie ist Lvoff geneigt, auch die in den Pflanzensäften vorhandenen Chromogene als Leukoverbindungen anzusprechen, die aus den Pigmenten durch Addition von 2 Atomen Wasserstoff entstehen. Verf. prüfte demgemäß zunächst Methylenblau in genau derselben Weise wie früher die Rübensäfte auf ihr Verhalten gegen Hefe. Durch die I. Versuchsreihe, in der Hefanol, bezügl. Trockenhefe und frische Hefe bei Gegenwart von Saccharose auf Methylenblau einwirken, wird die Analogie zwischen der Wirkung des Methylenblaues und der Wirkung der pflanzlichen Pigmente auf die Gärung erwiesen. Daran knüpft Verf. folgende Überlegungen über die Struktur und chemische Beschaffenheit der pflanzlichen Pigmente und Chromogene: Pflanzliche Pigmente sind wahrscheinlich Körper mit doppelter Bindung im Molekül, in welche 2 Atome Wasserstoff unter Bildung der entsprechenden Leukoverbindung eintreten können; diese Reaktion geht unter Einwirkung der Hefenreduktase als Aktivator, nicht aber des molekularen Wasserstoffs leicht unter Entfärbung des Saftes vor sich. Pigmentlösung mit Wasserstoff allein behandelt wird nicht entfärbt. In den Leukoverbindungen, den Chromogenen, ist der Wasserstoff locker gebunden und wird durch molekularen Sauerstoff unter Beihilfe der Oxydasen bis zum Wasser verbrannt. Im II. Kapitel untersucht Verf. die Vergärung des Zuckers unter dem Einfluß der Reduktase und bespricht zunächst die über den Chemismus des Zuckergehalts geltenden Theorien, denen allen nach Ausführungen des Verf. das gemeinsam ist, daß der Prozeß der Hexosenspaltung als ein doppelseitiger anzusehen ist, nämlich als eine Oxydation und gleichzeitig eine Reduktion. Als wirksames Agens des ganzen Zuckerzerfalles ist danach die Reduktase der Hefezelle aufzufassen. Verf. versuchte nun in 12 weiteren Versuchen durch zweckentsprechende Durchführung derselben die in den einzelnen Stadien auftretenden Zwischenprodukte zu bestimmen. Für seine Berechnungen stützt sich Verf. auf das von Kostytschew aufgestellte Gärungsschema, welches nach folgenden 3 Gleichungen verläuft: I. $C_6H_{12}O_6 = 2\,CH_3COCOOH + R.H_4$. — II. $2\,CH_3CO.COOH = 2\,CH_3COH + 2\,CO_2$. — III. $2\,CH_3COH + R.H_4 = 2\,CH_3CH_2OH + R$. Die Versuche IV—IX wurden mit Trockenhefe nach Lebedew und wechselnden Mengen Methylenblau ausgeführt. Überall ergab sich eine sehr starke Verminderung der Alkohol- und der Kohlensäurebildung. Und zwar wurden beide Gärungskomponenten parallel vermindert wobei das Verhältnis $CO_2 : CH_3.CH_2OH$ stets nahe der theoretischen Norm lag. In Versuch V wurde mit so großen Mengen Methylenblau gearbeitet, daß fast keine Gärung eintrat. Daraus geht hervor, daß beide Gärungskomponenten des zeitweise an die Reduktase gebundenen Wasserstoffs bedürfen, damit die Gärungsreaktion vor sich gehen kann; d. h. also der Reduktionsvorgang spielt sich früher ab, als die Abspaltung des CO_2 und des $CH_3 . CH_2OH$. Die Versuche X—XV wurden mit Lebedewschem Mazerationssaft angestellt. Aus dieser Versuchsreihe zieht Verf. die Schlüsse, daß 1. das erste oder wenigstens eines der ersten Stadien der Alkoholgärung die Aktivierung zweier H-Atome durch die Hefenreduktase ist, 2. der von der Reduktase zeitweilig gebundene Wasserstoff zum normalen Verlauf der Gärung nötig ist und zwar für beide Komponenten der Gärungsgleichung, 3. Aldehydreaktion konnte L. nicht nachweisen. Im dritten Teil seiner Arbeit schildert L. 10 Versuche über Selbstgärung der Hefe und findet, daß trockene Hefepräparate ohne Zuckerzusatz mit H_2O vermischt, eine ziemlich energische Reduktion des Methylenblaus hervorrufen, dabei wurde beobachtet, daß das Methylenblau die Ausscheidung von CO_2 stimuliert; zahlenmäßig konnte L. feststellen, daß 1 Gramm-Molekül Methylenblau bei der Selbstgärung 1 Gramm-Molekül Wasserstoff (2 Gramm-Atome) entzieht und die Ausscheidung von 1 Gramm-Molekül CO_2 hervorruft. Dieser fermentative Vorgang findet nur bei der Selbstgärung statt, in Gegenwart von Zucker wird der entgegengesetzte Vorgang beobachtet: die Entziehung zweier Atome Wasserstoff verringert die Ausscheidung von CO_2 um 2 Moleküle. Dieses unterschiedliche Verhalten beruht nach Grigoriew und Gromow auf dem Abbau von Eiweiß, denn nach Versuchen beider Autoren wird in Gegenwart von Zucker bei der Gärung 6,8 Proz., ohne Zucker dagegen 49,8 Proz. des Eiweißes abgebaut. Als Endresultate über die Selbstgärung der Hefe gibt L. folgende Schlüsse an: In dem gärenden Medium befindet sich eine Substanz, die in Abwesenheit von Zucker imstande ist, 1 Molekül CO_2 abzuspalten unter gleichzeitiger Entfernung zweier Atome Wasserstoff. Dieser enzymatische Vorgang wird durch Erwärmen des Gärmediums unterbunden. Nach L. ist die ganze Zymasewirkung als spezieller komplizierter Fall der Reduktasewirkung aufzufassen.

Bischkopff (Berlin.)

Muth, Fr., Über den Einfluß des Frostes auf die Zusammensetzung des Mostes und Weines der Trauben. (Jahresber. d. Vereinig. f. angew. Botan. 10 (1912). 1913. p. 115—144.)

Das Hauptergebnis der vorliegenden Untersuchungen ist, daß: „durch den Frost eine Erhöhung des Mostgewichtes und eine Verminderung der Säure des Mostes und des Weines" eintritt. Der Säurerückgang wird nicht durch bakterielle Äpfelsäure-Gärung (eine solche konnte nur in einem Falle beobachtet werden) hervorgerufen, sondern im wesentlichen verursacht durch Ausscheidung von Weinstein beim Gefrieren, daneben vielleicht auch durch Absättigung saurer Phosphate durch Kalium und andere Basen. Der Aschengehalt der Moste und Weine aus gefrorenen Trauben zeigt eine erhebliche Zunahme, besonders an Kalium, trotz der Ausscheidung desselben als Weinstein; das Mehr stammt nach Verf. aus den Hülsen.

Weitere Einzelheiten, die sich auf Gärungsvorgänge, Stickstoffgehalt, genauere Aschenanalyse, Einfluß verschiedener Behandlung nach dem Gefrieren usw. beziehen, sind aus dem Original zu ersehen.

Rippel (Augustenberg).

Meißner, R., Über die Bildung flüchtiger Säure in zuckerfreien Weinen und Nährlösungen bei Luftzutritt durch reingezüchtete Weinhefen. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. II. p. 128—146.)

Zur Klärung der Frage nach der Säurebildung in alkoholischen Getränken, speziell Wein und dem Anteil der Organismen an diesem Vorgang verfolgt Verf. die Säurebildung und Säurezerstörung einmal in künstlichen Nährlösungen, welche verschiedene organische Säuren wie Milchsäure, Äpfelsäure, Essigsäure, Weinsäure und Zitronensäure enthielten und dann in vergorenen Weinen. Diese verschiedenen Nährlösungen wurden mit einer ganzen Reihe von Hefen geimpft und später wieder untersucht. Verf. konnte auf diese Weise die Zerstörung von Gesamtsäure und die Neubildung von Säuren (flüchtige und fixe) durch Hefen sowie den Einfluß von Alkohol auf diese Vorgänge feststellen. Im I. Versuch mit den künstlichen Nährlösungen fand M. 1., daß die verschiedenen Hefenrassen alle mehr oder weniger flüchtige Säure aus organischen fixen Säuren bilden, 2. daß Milchsäure von den Organismen (in verschiedenem Grade) zerstört wird, teils unter Bildung von flüchtiger Säure, 3. daß aus Äpfelsäure Bernsteinsäure, aus Weinsäure Zitronensäure, ebenfalls flüchtige Säure neben Milchsäure gebildet wird. M. befindet sich mit diesen Ergebnissen, wonach beim Hefenwachstum Abbau fixer und Bildung fixer und flüchtiger Säuren stattfindet mit Osterwald in Widerspruch, welcher meint, daß ein Abbau fixer Säuren bei der Bildung flüchtiger Säuren durch Hefen nicht in Betracht komme. Zur Klärung der Frage nach dem Einfluß des Alkohols auf die Säurevorgänge wurde eine II. Versuchsreihe mit vergorenen Rot- und Weißweinen angesetzt und die Ab- und Zunahme der Säuren genau verfolgt. Die Versuche dieser Reihe bestätigen die Ergebnisse der I. Reihe mit der Ergänzung, daß auch Alkohol an der Säurebildung beteiligt. Alles in allem ergeben die Versuche Meißners (wie auch anderer, wie Osterwalder, Lindner, Seifert, Buchner, Meisenheimer), daß die Säurefrage im Weine einen äußerst vielfältigen Vorgang darstellt. Bischkopff (Berlin.)

De Smet, La composition de la bière et sa stabilité. (Le petit Journ. du Brasseur. Année 21. 1913. p. 1390.)

Dans cette conférence le professeur De Smet étudie les conditions favorables ou non à la stabilité de la bière. Il passe en revue successivement les divers éléments de la bière et leur résistance soit aux ferments soit aux agents physiques et chimiques mis en oeuvre lors de la fabrication. Il examine successivement l'alcool, les hydrates de carbone, les matières azotées, les principes du houblon, l'acidité, les produits formés par le touraillage, les sels et les gaz dissous dans la bière. Il conclut en donnant quelques prescriptions intéressant la fabrication en brasserie. H. Kufferath (Bruxelles).

Petit, P., La question de l'eau. (Le petit Journ. du Brasseur. Année 21. 1913. p. 1613.)

P. s'occupe dans cette note de la question de l'eau en brasserie. Il n'insiste pas beaucoup sur les ferments nuisibles provenant de l'eau, attribuant à ce mode d'infection une importance secondaire. P. indique que pour stériliser l'eau on peut la filtrer ou la stériliser par les rayons ultra-violets. L'auteur s'occupe aussi de la question de l'influence des éléments de l'eau sur la fabrication, question encore très discutée. Il faut éviter les eaux renfermant des nitrites qui produisent des troubles de la bière. Les nitrates semblent moins à craindre: d'après P. l'addition de 20 gr. de nitrate par hectolitre n'a pas modifié les qualités de la bière (il ne faut pas oublier aussi que les nitrates peuvent donner naissance à des nitrites!). La présence de carbonate de Sodium est nuisible à la filtration, empèche la cassure, donne des moûts foncés, la levure s'affaiblit très vite. Les bières qui en résultent ont une fermentation secondaire défectueuse, elles sont très sensibles aux ferment lactiques. On conseille de détruire le carbonate par SO_4H_2 ou l'acide sulfureux, l'addition de plâtre peut être utile. Il faut fort aérer la levure, le levain subira le traitement à l'acide phosphorique. D'après P. l'eau pour brasserie doit renfermer une certaine quantité de calcaire, on en éliminera l'excés. Il n'admet pas la théorie de Windisch qui considère comme idéale pour la brasserie l'eau douce ne renferment que des traces de calcaire et de bicarbonate de magnésie. P. admet une teneur de 10 à 11 gr. de calcaire par hectolitre. Le bicarbonate de Magnésie est nuisible même à faible dose. P. indique les procédés pour se débarrasser de l'excés de calcaire (ébullition. addition de lait de chaux). Les conditions de composition de l'eau sont celles qui conviennent spécialement pour la France. H. Kufferath (Bruxelles).

Takahashi u. **Yukawa,** Die Pilze von „Shoju-Moromi". (Chemiker Zeitung. Jg. 35. 1912. p. 1307.)

„Shoju-Moromi" wird aus Shoju-Koji, Salz und Wasser hergestellt. Ersteres wird aus gedämpften Soja-Bohnen und geröstetem Weizen so ähnlich gewonnen wie Sake Koji aus Reis. Beim Brauen von Shoju spielen 3 Arten von Torula eine Rolle und zwar Torula shujo, T. shoju var. minuta, T. turbinata. Aus Plattenkulturen unter Verwendung von Shoju-Koji-Agar als Nährsubstrat wurden nach Reinigung der entstandenen Kolonien durch die Lindnersche Tröpfchenkulturmethode 9 diverse Pilze (darunter 9 Zygosaccharomycesarten) isoliert.

Matouschek (Wien).

Kita, G., Japanische Sojaindustrie. (Wchschr. f. Brauerei. Jg. 30. p. 549—552, 559—561.)

Verf. berichtet sehr eingehend über den gegenwärtigen Stand dieser wichtigen Industrie, die im wesentlichen noch nach alten in der Praxis bewährten Methoden und unbeeinflußt von den Ergebnissen wissenschaftlicher Forschung ausgeübt wird.

Als Rohstoffe werden entweder die Sojabohnen allein oder mit Weizen zusammen verwendet. Aus den in entsprechender Weise vorbereiteten Rohstoffen wird mit Wasser eine Maische bereitet, aus der man den „Koji" herstellt, indem man die Masse entweder mit Aspergillus oryzae impft oder sie der spontanen Infektion durch diesen in der Luft und in den zur Kojibereitung dienenden Kästen vorhandenen Pilz überläßt. Die völlige Durchsetzung der Masse, wobei die Entwicklung des Pilzes bis zur reichlichen Konidienbildung fortschreitet, geht zum Teil bei hoher Temperatur (38—40°) vor sich, sie nimmt drei Tage in Anspruch.

Die Bereitung der Soja aus dem Koji erfolgt durch Mischen des letzteren mit Salzwasser in einem Bottich von meist 40—45 hl Inhalt, in dem die Maische bis zur ausreichenden Aromabildung, meist etwa ein Jahr, sich selbst und der Einwirkung der sich einfindenden Hefen und Bakterien überlassen wird. Die fertig vergorene Maische wird, meistens mit Wasser verdünnt, in kleinen Portionen ausgepreßt, die Preßkuchen werden nochmals in gleicher Weise behandelt. Das Filtrat wird durch Erhitzen in Eisenkesseln pasteurisiert, die durch Absetzenlassen oder durch Pressen in der Filterpresse gereinigte Flüssigkeit bildet die käufliche Sojasauce.

Verf. gibt am Schlusse seiner Ausführungen eine kurze Übersicht über die bisherigen Vorschläge und vergeblichen Versuche, die Sojabrauerei zu verbessern und sie besonders auch ökonomischer zu gestalten.

Rommel (Berlin).

Schepotieff, A., Untersuchungen über niedere Organismen. IV. Studien über Meeresbakterien. (Zoolog. Jahrb. f. Anat. u. Ontogenie. Bd. 34. 1912. p. 56—96; 3 Taf.)

Der Foraminiferenschlamm des Neapler Golfes wurde auf Bakterien hin untersucht. Desgleichen beschäftigte sich Verf. mit Rhodocapsa suspensa Molisch (gezogen aus faulender Hircinia).

Es ergaben sich folgende Hauptresultate:

1. Der ganze Bakterienkörper besteht aus Kernsubstanzen.

2. Aus Chromatinen oder deren Modifikationen sollen bestehen: die länglichen in den Alveolenwänden und -knoten liegenden Körner von bestimmter Färbbarkeit („Chromatinstränge“ genannt), die Bütschlischen roten Körnchen, die sog. A-Granula und die ersten Entwicklungszustände der Sporen. Nach Ansicht des Referenten aber ist die mehr oder minder intensive Färbbarkeit dieser genannten Körper ein viel zu geringes Unterscheidungsmerkmal gegeneinander. Es ist auch fraglich, ob wirklich die chromatinähnlichen Bestandteile des Bakterienleibes wirklich Chromatin sind. Leider wird auch der Begriff der „Modifikation“ des Chromatin zu wenig beleuchtet.

3. Im Sinne Ruziskas sollen die Grundsubstanz der Alveolenwände, die Körpermembran, die sog. C-Granula, die sporoiden Körper und die Sporen aus Plastin bestehen.

4. Das Plastin wird als Träger der Vererbungssubstanz angesprochen. Die Resultate der Arbeit bedürfen einer Nachprüfung.

Matouschek (Wien).

Matruchot, L. et **Desroche, P.,** Sur la végétation sulfureuse de la Pièce d'eau des Suisses à Versailles. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 75. 1913. p. 611—614.)

M. et D. indiquent que dans l'eau de la pièce d'eau des Suisses il se produit par fermentation anaérobie un fort dégagement d'hydrogène sulfuré. Ce gaz est oxydé par l'oxygène de l'eau à la lumière et par des algues sulfureuses Thiothrix et Chromatium. Dans les conditions de l'observation, ces algues forment un tapis épais surtout près des bords des bassins. La disposition de ces deux espèces est en rapport avec leur mode de vie. Chromatium est une algue vivant à l'ombre, la lumière ralentit son développement, elle demande une assez grande quantité d'hydrogène sulfuré aussi la trouve-t-on au contact immédiat de la vase et sous la végétation de Thiothrix. Les Thiothrix supportent facilement la lumière et recouvrent la couche de Chromatium. Lorsque ceux-ci ont utilisé tout l'hydrogène sulfuré de la vase, il n'est plus possible aux Thiothrix de se développer, cette algue meurt et l'on remarque que le tapis qu'elle forme présente des trous. Alors la lumière intervient pour tuer les Chromatium, l'hydrogène sulfuré n'étant plus arrêté par la couche de Chromatium est alors utilisé par Thiothrix qui se développe à nouveau. Il y a ainsi une balance continuelle dans le développement de ces deux algues. L'hydrogène sulfureux d'après M. et D. est entièrement détruit par ces deux algues, ainsi que ces savants l'ont prouvé expérimentalement; la lumière n'intervient pas en l'occurence. Lorsque l'oxydation (par la lumière et les algues) est insuffisante, l'hydrogène sulfuré se dégage en excès et produit une „infection“ de l'eau, les poissons sont tués et l'air est empesté d'hydrogène sulfuré. M. et D. renvoient pour les détails à un travail qu'ils viennent de publier — Pinoy ajoute quelques observations, il pense que le fort dégagement de la pièce d'eau des Suisses est dû à l'apport de matières fermentescibles (urine, etc.) la teneur de cette eau en chlorure de sodium atteint plus de 100 milligrammes par litre.

H. Kufferath (Bruxelles).

Smit, Jan, Bacteriologische en chemische onderzoekingen over de melkzuurgisting. [Bakteriologische und chemische Untersuchungen über die Milchsäuregärung.] (Acad. proefschr.) Amsterdam 1913.

Verf. beginnt das erste Kapitel (bakteriologischer Teil) seiner Arbeit mit einer Begriffsstellung der Gattung „Lactobacillus“ und fährt weiter fort mit einer genauen Beschreibung der von ihm hauptsächlich untersuchten Art Lactobacillus fermentum (Beijerinck), einer typischen stäbchenförmigen Milchsäurebakterie, welche sich durch kräftige Kohlensäurebildung in Malzextrakt und Maische von den anderen Vertretern dieser Gruppe unterscheidet. Diese Art konnte aus „Koningsgist“ und dem Sauergut der „Ned. Gist- en Spiritusfabriek“ zu Delft durch Anhäufung in Würze (10 bis 12°) in geschlossenen Stöpselflaschen bei 37—38° C immer gezüchtet werden. Wurde aber dieser Versuch bei 45° C ausgeführt, so blieb die Gärung aus und es häufte sich Lactobacillus Delbrücki an, der aber nur in Maische mit Erfolg weiter zu züchten war. Beide Arten ließen sich auf Maischenagar reinzüchten; L. fermentum wächst darauf in runden scharfbegrenzten weißen Kolonien, während L. Delbrücki darauf flache matt-gräuliche Kolonien mit buchtigem Umriß bildet. Aus einer Reihe von Versuchen zeigte es sich, daß L. fermentum als Stickstoffnahrung, die pflanzlichen Eiweißkörper gegenüber den tierischen bevorzugt, besonders diejenigen, welche in Würze, Maische und auch in Hefeextrakt vorhanden sind. Die Intensität der Säuerung war hierbei ein Maß für die Tauglichkeit der Stickstoffquelle. Bei Luftabschluß wurde immer mehr Säure gebildet, wie bei reichlichem Sauerstoffzutritt. In Hefeextrakt wurden von den Zuckerarten: Glukose, Levulose, Galaktose, Maltose, Saccharose, Laktose, Melibiose, und Raffinose gut; Mannose, lösliche Stärke, Erythrit schwach vergoren; nicht aber Arabinose, Xylose, Trehalose, Rhamnose, Sorbose, α-Methyl-Glykosid, Quersit, Sorbit, Mannit, Dextrin, Pepton (Witte), Inulin, Äpfelsäure, Ca-Malat, Ca-Laktat. Inversion fand statt von Saccharose und Raffinose, nicht aber von Laktose. L. fermentum entwickelt sich in angesäuerten sowie auch in alkalischen Kulturmedien schlecht, sehr geringe Säuremengen wirken aber günstig. Die Optimaltemperatur ist 33° C, die Maximaltemperatur 50° C; 2 Minuten dauerndes Erhitzen auf 65° tötet L. fermentum.

L. fermentum spaltet Glukoside nicht oder äußerst schwach (Indikan). Eiweißspaltende Enzyme konnten nicht nachgewiesen werden.

Den Erfahrungen des Verf. nach scheint L. fermentum eine in dem Hefefabriken allgemein verbreitete Art zu sein, welches mit seinem Vorkommen auf Getreidearten in direktem Zusammenhang steht. So wurde diese Art auch aus Brennereihefe der Fabrik „Hollandia“ zu Schiedam und aus der „konservierten Getreide-Brennereihefe“ der Firma Heinr. Helbing A.-G. zu Wandsbeck-Hamburg leicht isoliert. Verf. konnte aus durchgesäuerter Roggenschrotmaische nach obengenanntem Verfahren L. fermentum sowie auch L. Delbrücki züchten; aus Gartenerde wurde eine gärende Milchsäurebakterie isoliert, welche aber mit L. fermentum nicht identisch war. Eine schleimbildende Varietät wurde zufällig in einer zur Anhäufung von B. Delbrücki angestellten Kultur aufgefunden. Die Schleimbildung war aber nicht konstant.

Es konnten die isolierten Stämme des L. fermentum mit keiner einzigen der in der Literatur beschriebenen Laktobazillen vollständig identifiziert werden, zeigten aber mit der von Beijerinck beschriebenen Art (Arch. Néerl. Sér. II. T. 6. 1901. p. 212) große Übereinstimmung. Verf. faßt seine Stämme somit in einer Gruppe „Lactobacillus fermentum Beijerinck" zusammen, welche sich kennzeichnet durch Kohlensäurebildung, schnelle Säuerung zuckerhaltiger Flüssigkeiten, wobei weiter flüchtige Säure und Milchsäure entstehen, während aus Lävulose und Saccharose Mannit gebildet wird.

Die nachfolgenden Kapitel 2, 3 und 4 sind ausschließlich den chemischen Untersuchungsmethoden und ihrer Anwendung auf die von L. fermentum erzeugten Zersetzungsprodukte gewidmet.

Die qualitative Untersuchung (Kapitel 2) ergab als Resultat, daß aus Glukose, Lävulose, Galaktose, Maltose, Saccharose, Laktose und Raffinose; als flüchtige Produkte: Ammoniak, Alkohol, Essigsäure und Spuren Ameisensäure gebildet wurden (aus Lävulose aber kein Alkohol); als nichtflüchtige Produkte: Milchsäure und Bernsteinsäure, während nur aus Lävulose und Saccharose Mannit gebildet wurde.

Kapitel 3 handelt über die quantitativen Methoden zur Bestimmung der erzeugten Verbindungen, während in weiteren Kapiteln die Resultate, welche durch Anwendung der am meisten geeigneten Methoden erhalten wurden, niedergelegt sind.

Als Produkte der Vergärung von Glukose, Lävulose und Saccharose wurden Kohlensäure, Alkohol, Milchsäure, Essigsäure, Ameisensäure, Bernsteinsäure, Mannit und Glyzerin quantitativ bestimmt. Außerdem wurde das Gewicht der entstandenen Bakterienmasse festgestellt.

Der Alkohol wurde nach Destillation pyknometrisch bestimmt, die Kohlensäure gravimetrisch ermittelt, die Zuckerbestimmung nach Schoorl ausgeführt. (Nederl. Tydschr. Ph. Ch. Tox. 1899; Codex alimentarius dl. 4; Chem. Weekbl. 9. 1912. p. 687.) Die Bernsteinsäure wurde nach Guerbet ([Thèse], Paris 1906), die Essigsäure auf indirektem Wege bestimmt. Dazu wurde zuerst die Gesamtsäure durch Titration bestimmt, von dieser Zahl wurde die für Bernsteinsäure gefundene subtrahiert. Im Destillat von 50 ccm der Kultur mit Wasserdampf wurde die Ameisensäure bestimmt nach der Methode Fincke (Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel 21. 1911. p. 1), die Gesamtmenge der Milchsäure und Ameisensäure nach der Methode Ulzer und Seidel (Monatsh. f. Chem. 18. p. 138; Annal. Chem. 38. 1899. p. 58); die Menge der gebildeten Milchsäure kann also auch berechnet werden. Durch Subtraktion findet man die Quantität der Essigsäure. Die Mannitbestimmung wurde ausgeführt nach dem Prinzip der Methode zur Glyzerinbestimmung von Wagenaar (Pharm. Weekbl. 1911. p. 497), welche auch schon von Mutter (B. B. 14. 1011. 1881) angewendet wurde und die auf dem Vermögen mehrwertiger Alkohole, Kupfer in alkalischen Medien in Lösung zu halten beruht. Mit großer Sorgfalt hat Verf. diese Methode für die Mannitbestimmung in den Kulturen von L. fermentum nachgeprüft und anwendbar gemacht. Die hierbei störenden Verbindungen, wie Ammoniak, Aminosäuren, Zuckerarten, Glyzerin und Oxysäuren müssen durch vorherige Destruktion mit Calciumhydroxyd beseitigt werden. Dann wird der Mannit mittels Alkohol extrahiert; die erhaltene Lösung nach Vertreiben des Alkohols eventuell mit basischem Pb-Azetat gereinigt und darauf der Mannit nach der Methode Wagenaar bestimmt. Die Einzelheiten der angewendeten Methoden können hier nicht weiter besprochen werden.

Mit Hilfe der geprüften Bestimmungsweisen führt Verf. einige Analysen der in Hefewasser mit Glukose resp. Lävulose und Saccharose durch L. fermentum gebildeten Stoffwechselprodukte aus. In folgender Tabelle stellt er seine Resultate zusammen.

Produkte	Glukose %	Lävulose %	Saccharose %
Kohlensäure . . .	14,1	— (10)	17,4
Alkohol	16,9	1,6	16,8
Milchsäure	47,1	12,3	33,7
Essigsäure	3,7	12,9	6,1
Ameisensäure . .	0,1	0,2	0,1
Bernsteinsäure . .	1,2	1,4	0,9
Mannit	—	60,1	22,8
Glyzerin	6,3	—	—
Bakterien	3,5	— (1,5)	1,7
Im ganzen . . .	92,9	88,5(100)	100,5

Am Schluß seiner Arbeit bespricht Verf. seine Untersuchungen über die Mannitbildung durch einige andere Milchsäurebakterien, wobei es sich ergab, daß nur diejenigen Milchsäurebakterien aus Lävulose und Saccharose Mannit bilden, welche Kohlensäuregärung zeigen. Von den untersuchten Arten bildeten nur L. fermentum, Saccharobacillus pastorianus (v. Laer) und die Dextranmikrokokken neben Kohlensäure Mannit, nicht aber Bac. lactis acidi (Leichmann), L. Delbrücki, L. lactis, Bac. bulgaricus, Streptococcus Yoghurt und Spr. hollandicus. N. L. Söhngen (Delft).

Löhnis, F., Untersuchungen über den Keimgehalt der in Leipzig im Handel befindlichen Milchsorten. (Milchw. Zentralbl. Jg. 43. 1914. p. 9.)

Verf. berichtet zusammenfassend über bakterielle Prüfungen von Leipziger Handelsmilch, die innerhalb 6 Jahren unter derzeitiger Beteiligung von Kuntze, Lebeske, Schröter, Borck, Lösche, Müller, Wernike und Zieschang ausgeführt wurden. Reichlich 1000 Milchproben wurden geprüft.

Zur Ermittlung des Keimgehalts wurde aus praktischen Gründen Fleischextrakt- und Molkenagar benutzt und bereits nach dreitägigem Aufbewahren bei 38° C gezählt. Die Methode der direkten mikroskopischen Zählung nach Breed erwies sich als nicht überlegen gegenüber der üblichen Gußkultur (Plattenkultur). Gleichzeitig ist das Resultat der Schleuderprobe (nach Trommsdorff) mitgeteilt.

Marktmilch: 28 000—142 000 000 K. pro ccm, im Durchschnitt 7 bzw. 5,5 Millionen. 21 Proz. der untersuchten Proben enthielten weniger als 250 000 K. pro ccm, in 46 Proz. fanden sich mehr als 1 Million. In 12 Proz. der Proben konnten Mastitis-Streptokokken nachgewiesen werden.

Nach Aufbewahrung der Milchproben (ähnlich wie im Haushalt und in Milchgeschäften) bei Zimmertemperatur von morgens bis nachmittags 3—6 Uhr war die niedrigste Zahl 3½ Millionen, die Höchstzahl 16 200 Millionen; im Durchschnitt enthielten 70 in dieser Weise untersuchte Proben nicht weniger als 860 Millionen pro ccm.

Vorzugsmilch, Kindermilch usw. gleich nach dem Verkauf zeigte in ca. 80 Proz. der Fälle unter 25 000 K. pro ccm, der Keimgehalt hielt sich zwischen 1955 und 86 500, der Durchschnittswert betrug 20 300.

Aufbewahrung speziell bei Temperaturen über 20° C ließ den Keimgehalt natürlich bedeutend steigen. Weitere Zahlen illustrieren das Verhalten der Keimzahl bakterienarmer und bakterienreicher Proben bei 13—15° C, bei 22—24° C und bei Kühlhaltung.

Bei Verwendung sterilisierter Gefäße, bei Beachtung größter Sauberkeit und bei ständiger bakteriologischer Kontrolle ist es unschwer möglich, den durchschnittlichen Keimgehalt bis auf weniger als 500 pro ccm herabzusetzen, dauernd allerdings nur bei kleinen Milchlieferungen.

Bei Prüfung Leipziger Muster-Kindermilch („Ratsmilch") fanden sich pro ccm 30 000 bis 134 000, im Mittel 74 300 Keime, außerdem 0,2—2,2 ‰, im Mittel 0,7‰ Sediment in der Schleuderprobe. Nach eintägigem Aufbewahren belief sich der durchschnittliche Keimgehalt der bei 15° C aufbewahrten Milch auf 66 Millionen, bei 24° C auf 480 Millionen.

Eine sogenannte „sterilisierte Kindermilch" wurde stets keimhaltig gefunden, 100—350 000 Keime, 0,2—2‰ Sediment, in 9 von 18 Proben Mastitis-Streptokokken.

„Backhausmilch" enthielt gleichfalls stets lebende Keime und zwar 500—5000, 0,2—1,2‰ Sediment, in 6 von 19 Fällen Streptokokken. Sowohl diese wie die sterilisierte „Kindermilch" zeigte nach Rothenführer ausreichende Erhitzung, in beiden Fällen ergab sich bei Aufbewahrung nur geringe Keimveränderung.

„Enzymamilch", „biorisierte" Milch zeigte nur in 40 Proz. der untersuchten (26) Fälle weniger als 50 000 Keime, wohl weil die Milch in den nicht sterilisierten Flaschen mehr oder weniger starken Kontaktinfektionen unterlag; im Mittel wurden 330 000—351 000 Keime pro ccm gezählt. Die Enzymreaktion war nicht völlig unverändert. Die Schleuderprobe lieferte 0,1—0,6‰ Sediment, keine Streptokokken.

Von 38 Proben „Uviolmilch" (nach Seiffert) wiesen nahezu 50 Proz. mehr als 50 000 Keime pro ccm auf, die Gesamtkeimzahl betrug im Mittel 112 900—174 680. In 8 Fällen fanden sich Streptokokken vor, das Sediment betrug 0,2—3,0‰. Die Preisverhältnisse der untersuchten Milchproben sind angegeben. Wolff (Kiel).

Huyge, C., Index bibliographique des travaux parus sur le lait et les produits laitiers pendant l'année 1912. (Annuaire de la Stat. agron. de l'État à Gembloux. 1913. Vol. II. p. 523—352.)

Dans cet index, qui compte 757 travaux, H. groupe les matières suivant les spécialités, on y trouve ce qui concerne le lait, le beurre et ses succédanés, la fromagerie, le commerce des produits laitier et les statistiques. Dans chacun de ses groupes sont cités les travaux de bactériologie correspondants.
H. Kufferath (Bruxelles).

Harding, H. A., Ruehle, G. L., Wilson, J. K. and Smith, G. A., The effect of certain dairy operations upon the germ content of milk. (New York Agr. Exp. Stat. Bull. 365. 1913. p. 197—233.)

The bacterial content of the mixed milk of the station herd was reduced by protecting the pails from dust during the time between the steaming and the milking. The bacterial content was not appreciably changed by covering the wooden walls of the stable with plaster, by painting, or by clipping the long hairs from the udder, flank and tail. There was no perceptible advantage in cleaning the cows before milking with a vacuum cleaning apparatus over the ordinary hand cleaning. When the vacuum was not maintained at one-half atmosphere, the difference in bacterial content was in favor of hand-cleaning. Under the conditions existing in the station barn the number of bacteria was only slightly increased by the usual operations following milking.

Rogers (Washington).

Hewlett, R. T., Villar, S., u. Revis, C., On the Nature of the cellular Elements present in Milk. Part IV. The histological Appearances of the Udder. (Journ. of Hyg. Vol. 13. 1913. p. 57.)

The results of the histological examination of several udders are detailed (normal goat, two cows with slight non-suppurative mastitis, three cows with tuberculous infection but not of the udder).

Polymorphonuclear leucocytes are very scanty in the inter-alveolar tissue, and none was detected in the lumina of the alveoli. In the sub-epithelial layer, cells corresponding to the "germinal" cells of Winkler were detected, supporting his conclusions respecting the origin of the epithelium from these cells. Various cells are present in the lumina of the alveoli, corresponding with those met with in milk, and a study of their appearances confirms the view previously expressed by the Authors that the multinucleated cells are cells derived from the "germinal" layer, and that the cells found in milk, either normally or in ordinary catarrhal or interstitial non-suppurative mastitis are for the most part, if not entirely, tissue cells.

R. T. Hewlett (London).

Fettick, Otto, Schleimige Milch, durch den Bac. mesentericus fuscus hervorgerufen. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 23. 1913. p. 416.)

Fettick untersuchte eine Milch von durchaus anormaler Beschaffenheit, die sich besonders durch ihre schleimige Konsistenz auszeichnete. Bei längerem Stehen oder beim Zentrifugieren schied sich Caseïn in Form eines schleimigen Gerinnsels aus, während die überstehende Molke keinen schleimigen Eindruck machte. Die Viscosität der Milch war beträchtlich erhöht, 100 ccm brauchten zum Ausfluß 58 Minuten, normale Milch 12 Minuten. Die Zusammensetzung der Milch war folgende: Spez. Gew. 1,0186, Fett 3,56 Proz, Trockensubstanz 6,0 Proz., Asche 0,355 Proz. Reaktion alkalisch. Die bakteriologische Untersuchung ergab das Vorkommen von Bac. mesentericus fuscus fast in Reinkultur. Nebenher wurde noch Chalara mycoderma und Micrococcus acidi lactici gefunden. (Der Umstand, daß nach Fettick Bac. mesentericus fuscus eine Schleimbildung verursachen kann, ist meines Erachtens kein Beweis dafür, daß im vorliegenden Falle eine solche stattgefunden hat. Es wird sich hier um eine von Anfang an pathologische Milch handeln, wie aus den exorbitant niedrigen Werten für das spez. Gewicht, die Trockensubstanz (und

die fettfreie Trockensubstanz!) und für die Asche hervorgeht, und was von Fettick vollkommen übersehen wird. Ref.).

Grimmer (Dresden).

Rasquin, M., Le lait et les microbes. (Journ. soc. agric. du Brabant-Hainaut. T. 59. 1914. p. 49.)

Article de vulgarisation indiquant l'origine des microbes du lait, le mode de la contamination et les mesures à prendres pour éviter les souillures microbiennes du lait. L'auteur insiste sur la nécessité de refroidir le lait immédiatement après la traite et cite les expériences du Prof. L. Marcas.

H. Kufferath (Bruxelles).

Stowell, E. C., Hillard, C. M. and Schlesinger, M. J., A biometric Study of Streptococci from Milk and from the human Throat. (Science. Vol. 38. 1913. p. 373.)

The authors studied 240 strains of streptococci isolated from milk and from the human throat and compared them as to their morphology, gram stain, gentian violet reaction by the plate method, and their quantitive acid production of acid in 7 carbohydrates. Hemolysis was studied in 92 strains. They were unable to make correlation between the length of chain and the relation to violet stain with any other character. Out of 92 strains 17 gave hemolysis when streaked on blood agar plates. Five of the cultures came from normal milk, five — the most vigorous hemolizers — were from milk where udder trouble was indicated and seven were normal throat forms. The 7 substances tested showed a definite order of availability for acid production. The order and the percent of culture yielding 1.2 per cent or more of acid when grown at 37° C. for three days is shown in the following table:

Glucose	98.0 %
Lactose	76.0 %
Saccharose	65.5 %
Salicin	42.7 %
Raffinose	37.5 %
Inulin	9.0 %
Mannite	1.5 %

The degree of availability is closely associated with the size and complexity of the substance. The following features separate milk streptococci from throat streptococci: 1. Milk streptococci yield over 2.5 per cent acid in lactose and saccharose at 37° C. 2. They seldom ferment substances higher in the metabolic series than saccharose. 3. They readily ferment dextrose, lactose and saccharose at 20° C. On the other hand throat streptococci 1. seldom yield over 2.5 per cent acid in any substance; 2. over 40 per cent of the cultures yield over 1.2 per cent acid in either salicin or raffinose; 3. at 20 per cent they almost never attack any of the 7 substances.

Heinemann (Chicago).

Drews, R., Die Milchversorgung großer Städte mit spezieller Berücksichtigung der Verhältnisse in Hamburg. (Deutsche Vierteljahrsschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. Bd. 45. p. 592—637.)

Die Einleitung bringt zunächst allgemeine Angaben, so z. B. über Zusammensetzung der Kuhmilch im Gegensatz zu Frauenmilch, dann wird die Wichtigkeit der Milch als Nahrungsmittel beleuchtet und hierauf folgen Zahlen über die Gesamtmilchproduktion in Deutschland (25½ Millionen Liter im Werte von 2,1 Milliarden Mark) und Verbrauchsziffern der Milch in den größeren deutschen Städten. Die von der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft ermittelten Zahlen sind noch etwas höher. Den Angaben über Verbrauch schließen sich die Produktionskosten und Verkaufspreise in den verschiedenen Gegenden Deutschlands an und sehr interessante Mitteilungen folgen über den Verbrauch in den einzelnen Familien im Gegensatz zu anderen Nahrungsmitteln. Sehr lesenswerte Mitteilungen (p. 601 ff.) zeigen die bekannte Wichtigkeit der Milch als Volksnahrungsmittel.

Nach dieser Einleitung werden die wirtschaftlichen Verhältnisse Hamburgs betrachtet, wobei naturgemäß die Städte Altona, Wandsbek und Harburg mit eingezogen werden, da solche örtlich und verkehrlich eng miteinander verbunden sind. Es zeigt sich hier, daß Hamburg und die mit ihm verbundenen drei anderen Städte sich in äußerst günstiger Lage befinden, da in denselben resp. in deren Umgebung von 50—60 km laut statistischem Ausweise mehr als 105 000 Kühe vorhanden sind, so daß bei Zugrundelegen der festliegenden Verbrauchsziffern für diese Städte ein Überschuß an Milch von 45 000 Kühen verbleibt. Sonach ist diese Städtevereinigung in dieser Hinsicht äußerst günstig gelegen und verfügt über meist tadellose und dabei sehr preiswerte Milch. — Dann entrollt der Verf. sehr zeitgemäße Bilder der Kuhställe aus der „guten alten Zeit“ und der jetzigen modern-hygienischen Stalleinrichtungen, wobei lehrreiche Angaben über die richtige Melkweise, Milchgewinnung, die hierher gehörigen Maßnahmen betreffend Abkühlung, Transport, Milchverkauf und Aufbewahrung im Hause folgen.

Sodann werden Einzelbestimmungen des Hamburger Gesetzes von 1894 „betreffend des Verkehrs mit Kuhmilch“ angeführt und hier die Begriffe über Voll-, Halb- und Magermilch präzisiert und der gute Einfluß des Gesetzes konstatiert, dessen Folge ein wesentlicher Rückgang aller Milchfälschungen ist; hiernach wird noch die segensreiche Einwirkung des Vereins „Gesunde Milch“ hervorgehoben. Die in den Viehbeständen der Vereinsmitglieder seit drei Jahren eingeführte Tilgung der Tuberkulose nach dem Ostertag schen Verfahren liegt in den Händen der Landwirtschaftskammer für Schleswig-Holstein resp. des bakteriologischen Institutes für Tierseuchen in Kiel und der Hamburger bakteriologischen Station. — Die energisch durchgeführten Maßnahmen und Untersuchungen haben schon ganz außerordentlich günstige Verhältnisse herbeigeführt. In gleicher Weise wurde auch die Streptokokkenfrage verfolgt und seit Mai 1909, darf die von der Hamburger Polizei beanstandete Streptokokkenmilch nicht mehr in die angeschlossenen Meiereien abgeliefert werden. — Auch in Hamburg und seiner Umgebung wurde leider wie in anderen Orten die große Gleichgültigkeit in dieser so wichtigen Angelegenheit von seiten des konsumierenden Publikums konstatiert. — Die Verkaufs- und Wohnräume der Milchhändler werden von seiten der städtischen Wohnungspfleger (p. 615—616) periodisch einer Besichtigung unterzogen.

Hierauf geht Verf. auf die Kindersterblichkeit über und bespricht die vielerorts getroffenen Maßnahmen zur Eindämmung derselben; beigegebenes Zahlenmaterial dient zur Erläuterung. Daß die Verhütung von Magendarmkrankheiten aller Art der beste Schutz gegen die häufig tödlich verlaufenden Sommerdiarrhöen der Kinder ist, wird energisch betont. Auch in Hamburg steht die Kindersterblichkeit im umgekehrten Verhältnis zum Einkommen der Eltern. Kurz werden dann Vorzugs-, Sanitäts-, Kur- und Säuglingsmilch besprochen und an dieser Stelle auch die Hamburger Kontrollmilchanstalten hervorgehoben; ob in den letzten Jahren eine Steigerung der

Milchqualität erzielt wurde, ist nicht angegeben. Bezüglich der Kindermilch erfahren wir, daß sie durchweg nichts anderes als eine tatsächlich unverfälschte Milch ist, aber bezüglich des Schmutzgehaltes durchaus nicht einwandsfrei dasteht. Die Seiten 622—627 sind mit ihren Einzelheiten und dem Zahlenmaterial den Interessenten besonders zu empfehlen. Nach der Zitierung der Erfahrungen einzelner Milchfachmänner in anderen Städten stellt Verf. dann die nachstehenden Sätze auf:

1. Die Milchproduktion und der Milchhandel bedürfen der Regelung durch ein Reichsgesetz, das der landespolizeilichen Regelung noch genügend Raum zur Betätigung läßt.
2. Für große Städte ist eine Zentralisierung der Milchversorgung einzurichten.
3. Zur Ausschaltung der Mißstände in der Milchversorgung großer Städte ist eine Konzessionspflicht im Milchhandel einzuführen. Die Konzession darf nur vergeben werden zur Errichtung einer Milchhandlung, wenn der Bewerber gewisse Bedingungen in wirtschaftlicher, moralischer und fachmännischer Beziehung erfüllt.

Der fertiggestellten Arbeit wurde noch ein Nachtrag beigegeben, welcher wichtige Angaben über die Hamburger Milchküchen, Art der abgegebenen Milchsorten, deren Zubereitung resp. Zusammensetzung, Menge usw. enthält. Den Schluß bildet die wörtliche Mitteilung des neuen Gesetzes über den Verkehr mit Milch, welches der Senat der Bürgerschaft bereits vorgelegt hat.

Rullmann (München).

Andrewes, F. W., The cytology and bacteriology of condensed milks. (Journ. of Pathol. and Bacter. Vol. 18. 1913. p. 169—173.)

Verf. teilt die konservierte Milch in drei Klassen: 1. natürliche Milch, welche den vollständigen Rahm enthält, unversüßt, gar nicht oder wenig kondensiert ist. Solche Milch wird beim Vorbereiten sterilisiert und zeigt kein Bakterienwachstum. 2. Milch, bis auf ¼ oder mehr ihrer Masse kondensiert, und Zucker hinzugesetzt. Diese Milch ist nie steril. Milch dieser Klasse kann in zwei Gruppen geteilt werden, a) diejenige, die den vollständigen Rahm der Milch enthält, b) diejenige, welche von dem größten Teile des Fettes befreit ist. 3. Jener Typus konservierter Milch, in der die Milch ausgetrocknet und als ein konserviertes Pulver aufgetragen wird. Verf. behandelt diese Gruppe nicht.

Was die anderen Gruppen anbetrifft, so findet Verf., daß die polymorphonukleären Leukozyten in den Proben der Milch, die zur Gruppe 1 gehören, sich innerhalb der Grenzen der in normaler, frischer Milch beobachteten 57—73 Proz. der Totalsumme halten. In Milch, die zur Gruppe 2 gehört, wechselt der Prozentsatz der polymorphonukleären Zellen zwischen 53 und 74 Proz. der Totalsumme. Es ist merkwürdig, daß der Prozentsatz in dieser Klasse der kondensierten Milch nicht vermehrt wird; Verf. glaubt, daß die Zubereitungsmethode wahrscheinlich daran die Schuld trägt. Um zu beweisen, daß die polymorphonukleären Leukozyten, die in der Milch gefunden werden, echte Leukozyten, und nicht epithelialen Ursprungs sind, muß man Ehrlichs triacide Flecken, welche die Neutrophilen granulieren, in frischer Milch entwickeln. Verf. machte seine Beobachtung mit frischer, menschlicher Milch. Im Hinblick auf die Streitfragen, die zwischen verschiedenen Forschern vorhanden sind, z. B. Winkler, Hewlett, Revis einerseits und Savage usw. andererseits bezüglich des Wesens dieser Zellen in der Kuhmilch, sollten weitere Versuche nach dieser Methode mit Kuhmilch ausgeführt werden. Die Methode ist aber leider für kondensierte Milch ohne Wert.

Was die in kondensierter Milch vom Verf. gefundenen Bakterien betrifft, so zeigte sich Staphylococcus pyogenes aureus in 31 unter 43 Proben billiger, mit Maschinen abgerahmter Milch. Verf. beweist, daß, obwohl kondensierte Milch eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der meisten Bakterien hat, doch die Staphylokokken leicht darin wachsen und für diejenigen, welche die Milch trinken, gefährlich sein können.

Stenhouse Williams (Reading).

Friedel, K., Besteht ein Zusammenhang zwischen Sammelmolkereien und einer angeblichen Unterernährung und der Säuglingssterblichkeit auf dem Lande? (Bayrische Molkerei-Ztg. Jg. 34. 1913. p. 505.)

Verf. vertritt die Ansicht, daß die Unterernährung auf dem Lande weit weniger darauf zurückzuführen ist, daß die Milch des Geldwertes wegen bis zum letzten Tropfen nach den Molkereien abgegeben wird, als auf die Verwöhnung der Leute in bezug auf das Essen, Unlust an dem Aufziehen von Kleinvieh und am eigenen Brotbacken. — Die Molkereien müßten das Pflichtgefühl besitzen, für die Ernährung der Bevölkerung hinreichende Mengen Milch zur Verfügung zu stellen; dann sollte die Ziegenhaltung mehr empfohlen werden. Wolff (Kiel).

Wolff, A., Blaue Milch. (Milchw. Zentralbl. Jg. 42. 1913. p. 571.)

Es sind die bisher bekannten Erreger der „blauen Milch“ zusammengestellt. Besonders interessant ist ein vom Verf. beschriebenes Oidium, das die Eigenschaft besitzt, im Innern seiner Zellen blauen Farbstoff zu speichern und so als Träger des Farbstoffes letzte Ursache einer Blaufärbung der Milch sein kann. Dieses Oidium wurde in blauer Milch gefunden, die der Molkereiversuchsstation Kiel zur Untersuchung eingesandt worden war. Die Erscheinung in der Praxis ist beschrieben und Mittel zu seiner Bekämpfung angegeben. Leider konnte der Fall infolge Zeit- und Geldmangel nicht an Ort und Stelle untersucht werden.

Die Bakterien der blauen Milch sind insgesamt nichtsporenbildende Stäbchen und zeigen verwandtschaftliche Beziehungen zu dem Bact. fluorescens. Sie wachsen aërob wie fakultativ anaërob, im allgemeinen bei tiefer Temperatur. Durch vorsichtiges Pasteurisieren werden sie verhältnismäßig leicht abgetötet. Wolff (Kiel).

Ziegenmilch als Kinder- und Krankenmilch. (Liegnitzer Molkerei-Ztg. Jg. 7. 1913. p. 644.)

Es ist der Plan einer Ziegen-Großmolkerei für Säuglingsmilch in der Nähe Berlins entwickelt. Die Muttermilch kann den Säuglingen keine Tiermilch ersetzen. Auch die Ziegenmilch muß durch Verdünnen mit abgekochtem Wasser oder Haferschleim auf andere Zusammensetzung gebracht werden. Freilich trifft zu, daß Ziegenmilch in erster Linie wegen der Haltung der Tiere höchstens zu 2—4 Stück, ferner wegen der davon abhängigen großen Tuberkulosefreiheit der Bestände und wegen der Pflege der Tiere durch den Besitzer selbst, nicht durch häufig wechselnde Viehwärter, auch wegen der leichten Reinhaltung von Tier und Stall usw. als Vorzugsmilch besonders in Betracht kommen kann. Wolff (Kiel).

Rasquin, M., Les fraudes du lait. (Le petit Journ. du Brasseur. Année 21. 1913. p. 1643.)

R. indique les procédés sommaires permettant de découvrir les fraudes du lait. Il conclut ainsi: Il est évident qu'une simple analyse, fût-elle même complétée d'un examen bactériologique, ne peut pas servir pour déclarer un lait donné comme tout à fait parfait. Sa détermination ne peut résulter que du fonctionnement d'un service de contrôle s'exercant pendant un certain temps et se répétant à intervalles. Pourtant cependant, on doit reconnaître qu'une bonne analyse d'un lait sur un échantillon pris à l'improviste constitue déjà une indication précieuse pour le consommateur. — Les conclusions sont d'application quotidienne. H. Kufferath (Bruxelles).

Detre, L., Die Milch als Trägerin von Infektionen. (Milchw. Zentralbl. Jg. 43. 1914. p. 143.)

Die 350 000 l Milch, die den Tagesbedarf für Budapest darstellen, werden durch Mischung des von zahlreichen Milchwirtschaften gelieferten Produktes auf eine einheitliche Qualität gebracht. Nach zahlreichen Untersuchungen dürfte es, wie der Vortragende ausführt, feststehen, daß etwa 10—15 Proz. von der in Großstädten in Verkehr kommenden Milch durch Tuberkulose infiziert sei. Ferner figuriert die Milch als guter Nährboden für Scharlachpirus, Typhusbazillen, Diphtherie usw. Von der Marktbutter sind ungefähr 17 Proz. infiziert. Der Redner fordert Pasteurisation. Die Sahne enthielte infolge Zentrifugierens den größten Teil der ursprünglich enthaltenen Keime. Infizierte Sahne hätte schon wiederholt Masseninfektion verursacht, zumal sie bei der Zubereitung von Crême (der Redner meint jedenfalls in rohem Zustande) benutzt wird. Wolff (Kiel).

Laxa, O., Über die Bedeutung der Wiesen und Weiden für die Milchwirtschaft. (Milchw. Zentralbl. Jg. 43. 1914. p. 145.)

Nachdem über den Wert der Wiesen und Weiden im allgemeinen und vom chemischen Standpunkte aus im besonderen, ferner von deren spezifischer Wirkung auf die Milchergiebigkeit und Güte der Milch speziell bei der Verwertung zu Kindermilch, Buttererzeugung und Käsebereitung gesprochen ist, wird im zweiten Teile des Themas die Bewertung der Grasplätze für die Milchwirtschaft in mikrobieller Hinsicht behandelt. Das Weiden des Milchviehs und das Melken im Freien trägt zur Gewinnung keimarmer Milch wesentlich bei. Die größte Bedeutung aber haben die Wiesen und Weiden, wie ausgeführt wird, für die Qualität der Mikroorganismen in der Milch; an dieser Vegetation entwickelt sich eine ganz besondere, zahlreiche nützliche Bakterien enthaltende (man könnte sagen edle!) Mikroflora, speziell gute Milchsäurebakterien (Bact. lactis acidi) enthaltend.

Wolff (Kiel).

Milch euterkranker Kühe. (Molkerei-Ztg., Liegnitz. Jg. 8. 1914. p. 161 u. Bayr. Molkerei-Ztg. Jg. 35. p. 141.)

Bei einer Stallrevision (Urteil des Landgerichts München 2) wurden von 25 melkenden Kühen 13 mastitiskrank gefunden, die weiteren 12 Kühe standen trocken, d. h. sie gaben überhaupt keine Milch. Dies ist ein Zeichen für die starke Verbreitung der Mastitis unter den Kühen. Die Tiere standen unzulässigerweise ohne Rücksicht auf die Beschaffenheit ihres Euters durcheinander. In einem Liter der Sammelmilch wurde durchschnittlich 0,8 g

Streptokokkeneiter nachgewiesen. Der Genuß dieser Milch war nach überzeugendem Gutachten geeignet, die menschliche Gesundheit zu schädigen, infolgedessen wurden die Angeklagten trotz erörterter Einwände bezüglich Pathogenität wegen fahrlässiger Herstellung gesundheitsschädlicher Milch zu Geldstrafe verurteilt.

Die Bayrische Molkerei-Zeitung fügt hinzu, daß im Sinne des Deutschen Reichs-Nahrungsmittelgesetzes diese Milch aus kranken Eutern mindestens als verdorben zu bezeichnen ist; derartige Mißstände seien energisch zu bekämpfen.
Wolff (Kiel).

Wagener, W., Zur Frage der Ernährung kranker Säuglinge mit Larosanmilch. (Münchener med. Wchschr. 1914. No. 7.)

Zur Ergänzung der im Centralbl. f. Bakter. bereits gemachten Angaben über Larosan, einem einfachen Ersatz der Eiweißmilch, können die neueren Erfahrungen dienen, welche der Verf. in oben zitierter Arbeit niederlegte. Da die von Finkelstein und L. Meyer eingeführte Eiweißmilch sich zwar bei der Behandlung von Ernährungsstörungen im Säuglingsalter vorzüglich bewährt hatte, die Schwierigkeit, ja Unmöglichkeit ihrer Herstellung im Privatbetriebe aber und die hohen Kosten des käuflichen Präparates einer allgemeinen Verwendung entgegenstanden, so wurde die Larosanmilchmischung zu den Versuchen herangezogen. Es ergab sich in Übereinstimmung mit anderen Autoren, daß in der Larosanmilch ein vollwertiger Ersatz der Eiweißmilch gefunden ist, welcher billiger im Gebrauch, einfacher in der Herstellung als diese ist und es dem Arzte ermöglicht, sich der Vorteile der Eiweißmilch in den betreffenden Fällen zu bedienen.
Rullmann (München).

van Ketel, B. A., Bacillus coli in der Milch. (Chem.-Ztg. 1913. No. 154/55.)

Während bisher angenommen wurde, daß nach einer richtig geleiteten Pasteurisierung von Milch sich keine Colibazillen mehr lebensfähig vorfinden dürfen und damit überhaupt der Beweis für die Abwesenheit pathogener Bakterien erbracht sei, sind jetzt neue widersprechende Ermittlungen gemacht worden. Bisher haben die meisten Autoren daran festgehalten, daß Colibazillen bei 62—65° C in einer Minute oder bei 59° C in 5 Minuten abgetötet werden, nun haben De Jong und De Graef neuestens unter elf von ihnen untersuchten Stämmen sieben Coliarten gefunden, welche nach ½-stündigem Erhitzen auf 65—67° C in Milch oder Bouillon noch lebensfähig waren. Einige ertrugen sogar ohne Schädigung ein 35 Minuten dauerndes Erhitzen auf 73—75° C in frischer Milch. Daß der Colibacillus auf verschiedenste Art in die Milch gelangen kann, ist ja allgemein bekannt. Sehr wichtig ist aber, zu wissen, welchen Einfluß die in der Milch enthaltenen verschiedenartigen Stoffe auf die Abtötung des Coli während der Pasteurisation ausüben, und so ist die Möglichkeit gegeben, daß die Bazillen hierbei von koaguliertem Eiweiß eingeschlossen und bis zu einem gewissen Grade geschützt werden, so daß auf diese Weise eine länger und höher gehende Erhitzung erforderlich wird. Wenn sich dann in einer derartig erhitzten Milch noch lebende Colikeime finden, so dürfte in obiger Ermittlung die Erklärung liegen. Verf. weist dann noch daraufhin, daß sowohl der Alkaleszens- als auch der Säuregrad der als Nährmittel dienenden Bouillon oder Milch sehr wichtig ist und daß Schwankungen hierin einen großen biologischen

Einfluß auf das Einsaatmaterial in günstiger aber auch ungünstiger Weise ausüben können, wodurch eine recht wesentliche Änderung in den biologischen Eigenschaften möglicherweise veranlaßt wird. — Hoffentlich folgen bald weitere Arbeiten hierüber. Rullmann (München).

Gabathuler, A., Ein Beitrag für Yoghurtkontrolle. (Zeitschrift f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 23. 1913. p. 368.)

Verf. fordert eine systematische Überwachung der Yoghurtfabrikation. Vor allem betont er, daß Bac. bulgaricus und die Milchsäurebakterien in ihrer Vollkraft nur in Milchkulturen, nicht aber in getrockneten oder halbflüssigen Präparaten enthalten sind. In vielen Pulvern und Tabletten war Bac. bulgaricus überhaupt nicht oder nur in stark verkümmerter Form enthalten. Zur normalen Yoghurtflora rechnet Verf. lediglich Bac. bulgaricus und Milchsäurestreptokokken, nicht aber Hefen. Die Untersuchung von Yoghurt führt Verf. folgendermaßen aus:

10—15 ccm Yoghurt werden mit 5—10 ccm Wasser versetzt, über der Flamme so lange erhitzt, bis sich im Kölbchen eine serumähnliche Flüssigkeit abscheidet. Dann wird filtriert, das Filtrat nach dem Abkühlen mit 5 ccm Äther versetzt, durchgeschüttelt und im Trommsdorffschen Röhrchen 5 Minuten lang bei 1200 Touren geschleudert. In der Kapillare finden sich dann die Bakterien ohne jede Beimengung vor. Von diesen wird ein Tuschepräparat nach Burri hergestellt. Da die Tusche vielfach Hefen enthält, empfiehlt es sich, den Yoghurt anstatt mit Wasser mit einer wäßrigen Lösung von Methylenblau, Gentianaviolett oder Pikrinsäure zu erwärmen. Gefärbte Hefezellen gehören dann dem Yoghurt an, während weiße Hefezellen Tuschehefen sind. Soll ein Farbpräparat hergestellt werden, wird der Yoghurt mit reinem Wasser erwärmt, das Filtrat nicht entfettet und bei 50—60° zentrifugiert. Das Ausstrichpräparat wird in der üblichen Weise entfettet, fixiert und gefärbt. Grimmer (Dresden).

Schwarz, Yoghurt. (Deutsche Milchw. Ztg. Jg. 18. 1913. p. 1166.)

Verf. macht seine Mitteilungen auf Grund jahrelanger eigener Yoghurtherstellung, Yoghurtvertriebes und eigenen Yoghurtgenusses. Die lebensverlängernde Wirkung des Yoghurt an sich ist in Zweifel gezogen. Die Yoghurtherstellung in der Molkereipraxis ist, da die Milchverwertung eine gute und Mühe und Kostenaufwand gering sind, zu empfehlen. Flüssiges Ferment erscheint besser als Trockenpräparate. Um ein festes Koagulum zu erzielen, muß man die Milch beim Kochen etwas eindicken. Wolff (Kiel).

Belonovsky, G. D., Sur la prolongation de la vitalité du Bacille bulgare. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 75. 1913. p. 374—376.)

B. rappelle que le microbe de la Lactobacilline, le Bacille bulgare qui selon Metchnikoff joue un rôle actif dans la lutte contre la flore de l'intestin perd rapidement sa vitalité. Dans le lait le Bacille produit de l'acide lactique et des autotoxines qui agissent défavorablement (Makrinov, Conradi et Kuprjuweit). B. a constaté expérimentalement que si on neutralise l'acide lactique par le carbonate de calcium dans les milieux où l'on conserve le Bacille bulgare, on obtient une prolongation notable de la vitalité de ce microbe. Alors que du lait coagule à 35° après 100 heures s'il est ensemencé par une culture non neutralisée agée de 15 jours, on ne constate plus de microbes vivants après 3 mois de conservation dans le milieu non neutralisé. Si l'on ajoute au milieu 4 à 10 pour cent de craie, on constate après 4 mois qu'il y a coagulation du lait à 35° après 48 à 24 heures. Le bacille est donc resté très vivant et actif. Les proportions de craie de 6 à 10 pour cent sont les plus favorables. Ces expériences montrent que pour le Bacille bulgare il est avantageux de neutraliser par le carbonate de chaux les milieux qui doivent servir à conserver et à entretenir la vitalité de ce microbe. H. Kufferath (Bruxelles).

Wolff, A., Was ist Yoghurt und Intestibakter und worin besteht deren Wirkung. (Deutsche Vierteljahresschr. f. öffentl. Gesundheitspfl. Bd. 45. 1913. p. 673 ff.)

Einleitend wird betont, daß der Mensch bezüglich der Gesunderhaltung seines Körpers sehr viel den Fortschritten der Bakteriologie auf den verschiedenen Gebieten zu danken hat. Trotzdem heute der Kampf ums Dasein weit aufreibender ist, kann doch bereits von einer durchschnittlichen Verlängerung der Lebensdauer gesprochen werden. Sehr wichtig sind daher die Beobachtungen, welche uns den erfolgreich geführten Kampf, speziell im Darmtraktus, zwischen den schädlichen und nützlichen Bakterien angeben. Infolge unzweckmäßiger Ernährung setzen sich häufig im Dickdarm unverdauliche eiweißhaltige Substanzen fest, welche Autoinfektionen hervorrufen und zu schweren, unter Umständen lebenkürzenden Störungen führen. Hier sind zu erwähnen B. coli, B. putrificans, B. sporogenes und perfringans (die beiden letzten finden sich meist bei Blinddarmentzündungen), ferner Buttersäurebazillen. Ebensowenig wie direkt pathogene Keime von Typhus, Ruhr und Cholerabazillen, dürfen sich die vorher genannten anhäufen. — Nun sind von den nützlichen Bakterien, welche die schädlichen erfolgreich bekämpfen, zwei Gruppen ausgesprochener Milchsäurebakterien bekannt, und zwar zunächst die vom Typus Bact. lactis acidi oder Streptoc. lactis, ferner die Gruppe der langstäbchenförmigen, wie Bact. caucasicus oder Bact. caseï. — Ganz dürfen die Fäulnisbakterien nicht vernichtet werden, da sie wichtige Funktionen auszuführen haben, sie müssen aber durch die sogenannten Milchsäurebakterien im Zaume gehalten werden, und hierzu dient auch die viele Milchsäurebakterien enthaltende Sauermilch. Während die günstigen gesundheitlichen Einwirkungen der Sauermilch schon lange bekannt sind und benutzt werden, ist solches in noch erhöhterer Weise bei dem langstäbchenförmigen Bac. bulgaricus im Yoghurt der Fall. Letztere passieren den saueren Magensaft leichter lebend, siedeln sich an und produzieren erhöhte Säuremenge. Aus der ungemein reichen Yoghurt-Literatur ergeben sich sehr zahlreiche günstige Resultate, und abgesehen von seiner Verwendung als Kurmittel ist er auch als Nahrungsmittel zu empfehlen. — Die Angaben über Herstellung, Prüfung usw. sind als bekannt vorausgesetzt; neu aber ist, daß nach Metschnikoff die darmdesinfizierende Wirkung der Yoghurtbakterien nur bis zum Dickdarm reicht, weil sie dort keinen Zucker mehr als Nährstoffquelle findet. Hier aber, wo die Eiweißfäulnis am stärksten vor sich geht, sollte sie durch die Milchsäurebildung bekämpft werden, und da wäre eine Zuckerquelle erforderlich, um den Milchsäurebildnern als Nährquelle zu dienen. Metschnikoff hat dies durch eine aus Stärkemehl zuckerbildende Bakterienart jetzt erreicht, die sich gern im Dickdarm ansiedelt. Da Stärke, besonders bei Kartoffelgenuß, stets im Dickdarm enthalten ist, so gelingt es durch Zusatz dieser Bakterie, den Yoghurtbakterien ihre Wirkung auch im Dickdarm zu ermöglichen. Der Name dieser Bakterie ist Glycobacter peptolyticus = Intestibakter. — Kurze Angaben über die Präparate, welche die beiden Yoghurt- und Glykobakterien in Pulver und Tablettenform enthalten und zur Selbstdarstellung von Yoghurtmilch dienen, bilden den Schluß der Arbeit. Rullmann (München).

Doane, C. F., The Action of Bacillus bulgaricus in Suppressing gassy Fermentations in Cheese making[1]). (Science. Vol. 38. 1913. p. 377.)

It was found that pure cultures of B. bulgaricus could be used with perfect results in suppressing the undesirable fermentations, principally gas, which have worried Swiss cheese makers in the past. There seems to be some difference in the efficiency of different strains of B. bulgaricus for this purpose without respect to their activity in forming acid. The cultures of B. bulgaricus seemed to have no effect on flavor or texture. A more uniform cheese can be obtained by using cultures of B. bulgaricus especially during the summer. Heinemann (Chicago).

Edwards, S. F., Notes on Yeast-like Organisms in Whey. (Science. Vol. 38. 1913. p. 376.)[2])

During the summer 1909 some work was begun on the problem of so-called fruity flavor or sweet flavor in cheese in western Ontario. The whey from a number of cheese factories was obtained and yeast-like organisms isolated. Experimental inoculation of cheese with these organisms produced cheeses of flavors corresponding to the flavors resulting in the factory cheeses. Heinemann (Chicago).

Brown, Charles W., Action of a few common Butter Organisms upon Casein. (Science. Vol. 38. 1913. p. 378.)[3])

Degradation of casein may take place without the result being necessarily discovered by the naked eye. In many instances, where degradation has taken place, chemical means will show that the degradation is present, although not discovered by gross appearance. The power to liquefy casein by liquefiers is either stimulated or retarded by four important factors met with in storage butter: 1. addition of salt, 2. diminished supply of oxygen, 3. low temperature, and 4. association with Bact. lactis acidi. If plates are made on litmus milk agar from tubes, which show no visible action in 30 days some different pictures present themselves. 1. Some organisms produce a gradual clearing after 7 to 15 days. 2. If after 24 hours incubation the plates are stroked with B. lactis acidi some of the organisms produce a clear zone und around the clear zone a copious growth of the organism appears. 3. The same picture appears with the exception that the growth of the organism is not stimulated. 4. Growth of the lactic about normal, no acidity, the milk in the vicinity of the lactic completely dissolved and surrounded by copious growth of the organism. 5. The same except no stimulation of the organism. 6. Growth of lactic normal, no acidity, no clearing, but stimulated growth of the organism. 7. the same except no stimulation of the organism. Organisms generally spoken of as non-liquefiers influenced in their action upon casein by different factors cannot be overlooked as agents in the degradation of casein both in storage butter and ripening of cheese.

---

[1]) Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 40. p. 163.
[2]) Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 40. p. 163.
[3]) Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 40. p. 165.

P. G. Heinemann (Chicago).

Kleinböhl, H., Gervaiskäse. (Deutsche Milchw. Ztg. Jg. 18. 1913. p. 1255; Liegnitzer Molkerei-Ztg. Jg. 7. 1913. p. 658; Berliner Molkerei-Ztg. Jg. 23. 1913. p. 482 und Hildesheimer Molkerei-Ztg. Jg. 27. 1913. p. 1531.)

Die genannte Käsesorte wird in ihrem Ursprungsland, in Frankreich, laut Verf. keineswegs Gervaiskäse genannt, sondern führt je nach Form und Äußerem sehr verschiedene Namen, wie „Suisses, Demi-Suisses, Bondons, Demisels, Malakoffs, Petites Carres, National". Der „Gervaiskäse" stammt fast ausschließlich aus der Fabrik von Charles Gervais in Paris, der sich seinen Namen in Deutschland schützen ließ, oder von Pommel in Gournay en Bray, dessen Fabrik noch größer und älter ist. Es ist über Beschaffenheit und Fabrikation dieses Käses gesprochen und über gesetzliche Anforderungen, die an ihn gestellt werden. Wolff (Kiel).

Bleicken, Die Bedeutung der deutschen Weichkäserei. (Bayrische Molkerei-Ztg. Jg. 35. 1914. p. 61.)

Verfasserin empfiehlt die Testikulturen des Hygiene-Laboratoriums in Berlin-Wilmersdorf zur Bereitung von Weichkäsen nach französischer Art. Das Testiverfahren hat vor dem Reinkulturenverfahren nach Mazé den Vorteil, daß es nicht in mehreren, sondern in einer einzigen Kultur verwendet wird, ist demnach einfacher und bequemer. Die Kultur wird direkt der Kässereimilch zugesetzt, dann noch mittels Zerstäubers auf die frischen Käse gesprüht. Es soll das Testiverfahren auch ökonomischer sein. Wolff (Kiel).

Burri, R. u. Kürsteiner, J., Studien über die zweckmäßigste Käsereilabbereitung, I. Teil: Der Einfluß des Kasols auf den Säuregrad des Labes. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. Jg. 27. 1913. p. 409—431.)

Im Anschluß an einen geschichtlichen Überblick der bisherigen Bestrebungen zur Verbesserung der Käsereilabbereitung wird die von verschiedenen Seiten aufgestellte Behauptung, das Säurepräparat Kasol von R. Steinegger und J. Hohl lasse sich mit Erfolg als Mittel zur Regulierung des Säuregrades des Labes verwenden, einer eingehenden Prüfung unterzogen.

Beim näheren Studium der Maßnahmen, die einen vermehrten bzw. verminderten Säuregrad des Labes bedingen, zeigt es sich, daß das Auftreten eines hohen Säuregrades im Lab wesentlich von der Vorbehandlung des Labtopfes abhängig ist. In einem durch gründliches Ausdämpfen oder Ausbrühen von allen Bakterien befreiten Labtopf wird niemals ein kräftig saures Lab entstehen. Dagegen kann man mit Sicherheit auf ein Lab mit relativ hohem Säuregrad rechnen, wenn in dem benutzten Topf noch säurebildende Bakterien vom vorhergehenden Lab vorhanden sind, was der Fall ist, wenn man den Topf nur ausleert oder irgendeinem Reinigungsverfahren unterwirft, das nicht alle Bakterien entfernt oder vernichtet. In dem absichtlich oder zufällig veranlaßten Verbleiben von Impfstoff im Labtopf liegt der Schlüssel für die Erklärung der Entstehung von Laben mit hohem Säuregrad und für die Regulierung des Säuregrades im Lab überhaupt.

Bezüglich der Rolle, welche das Kasol bei der Entstehung des Säure-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

grades spielt, hat sich bei den Versuchen ergeben, daß Kasol fast durchwegs den Säuregrad etwas herunterdrückt, d. h. von zwei sonst gleich angesetzten Laben ist das mit Kasol angesetzte immer etwas weniger sauer, möge es sich im übrigen um schwach saure oder stark saure Labe handeln. Hieraus geht hervor, daß Kasol ganz unmöglich die Rolle eines Regulators des Säuregrades im Lab spielen kann.

Zugegeben wird, daß dem Kasol eine blähungshemmende Wirkung zukommt. Doch ist zu berücksichtigen, daß die in nicht sterilisierten Töpfen angesetzten Labe an und für sich wegen der kräftigen Säuerung eine Blähung meist nicht aufkommen lassen und daß das Ausbleiben der Blähung, falls solche Labe mit Kasol behandelt sind, mit Unrecht nur der Verwendung dieses Mittels gut geschrieben wird. Übrigens ist erwiesen, daß die Unterdrückung der Blähungserreger auch durch verschiedene andere Säuren bewirkt werden kann.

Anschließend empfehlen die Verf. den praktischen Käsereiversuch auf exakter Grundlage. Um die Überlegenheit einer Labzubereitungsart über eine andere festzustellen, ist notwendig, daß man während langer Zeit ein genügend großes Milchquantum in zwei Hälften teilt und nebeneinander und möglichst nach demselben Fabrikationsverfahren, aber unter Verwendung der zu vergleichenden Labsorten, je zwei Käse herstellt und deren Ausfall verfolgt. Autoreferat.

Einseitig geblähter **Käse.** (Milchw. Zentralbl. Jg. 43. 1914. p. 143.)

Einseitig geblähte Käse sind solche, die auf einer Seite, und zwar gewöhnlich auf der Strebelseite, zu viel ansetzen und gelegentlich schon auf der Presse tönen. Charakteristisch ist dann, daß der Schnitt durch einen solchen Käse sich später 2—3 ccm unter die Rinde hinein rissig zeigt. Die Erfahrung lehrt, daß der Fehler dann gern entsteht, wenn beim Herstellen großer Käse viel „Saub“ sich bildet. Das durch das Bewegen hervorgerufene unregelmäßige Lagern kleine und große Bruchkörner bzw. das Gemisch von großen Bruchkörnern und Staub bedingt dann die oben erwähnte Gärungserscheinung. Es ist angezeigt, nach dem Zubodenrühren den Brecher noch einen Augenblick in der Mitte des Kessels festzuhalten, da dann beim Herausziehen des Rührwerkzeuges noch eine Vermischung des Bruchs stattfindet, die günstig wirkt. Die Käse werden dann oft auch einseitig, wenn ein großer Strebel auf der Oberfläche verteilt werden muß oder wenn der Käse beim Herausnehmen sich überwirft, wobei dann sämtlicher Käsestaub und die groben Körner in der Mitte zusammengedrängt werden. Ebenso kann einseitiges Salzen und überhaupt langes Liegenlassen auf einer Seite die Einseitigkeit der Käse begünstigen. Wolff (Kiel).

Mazé, P., L'Affinage des fromages moisis et les ferments qui y président. (Journ. d'agricult. prat. 78. 1914. p. 44 à 47.)

M. a montré l'importance des ferments lactiques dans le caillé, il étudie l'affinage qui fait suite à la production du caillé. L'auteur n'examine ici que les fromages moisis. Le caillé se recouvre d'abord de mycodermes et d'Oïdiums. Les moisissures n'envahissent qu'ultérieurement la surface du caillé. Le mycoderme domine au début et forme un enduit gras qui se ternit lors de l'envahissement de l'oïdium et des champignons. Le mycoderme et l'oïdium opèrent des transformations chimiques dans le caillé, il se forme de l'acétate d'éthyle (odeur de pomme mûre). La moisissure fait disparaître ces parfums, l'odeur rappelle celle du champignon de couche. Les organismes signalés attaquent l'acide lactique, le lactose, l'acide acétique et des produits aromatiques. Quand ces corps sont détruits, ils attaquent les matières grasses ou la caséine. Pour éviter cette action sur la caséine et les matières grasses on arrête la fermentation soit en séchant le fromage (production lente d'ammoniaque) soit en favorisant le développement de microbes antagonistes, les producteurs du „rouge", caractéristique du Camembert, du Brie, du Coulommiers. Les ferments du rouge se nourrissent des produits de décomposition de la caséine, ils finissent par supplanter les moisissures superficielles des fromages. Ils se développent en milieu alcalin, ils ne participent pas à l'affinage. On en compte plusieurs espèces, ils produisent de l'ammoniaque, ils ne fabriquent que peu de caséase et préservent le fromage de la coulure. Dans sa conclusion M. insiste sur l'utilité qu'il y a pour le praticien de s'inspirer des données exactes de la science et des avantages qu'on peut en retirer pour conduire rationnellement les fermentations en fromagerie. Kufferath (Bruxelles).

Steinegger, R., Förderung der Lochbildung im Emmentalerkäse. (Milchw. Zentralbl. Jg. 43. 1914. p. 57.)

Die Lochbildung im Emmentalerkäse wird von den Konsumenten oft gar zu kritisch verlangt. Verf. hat ein Mittel gefunden, daß die Lochbildung fördern soll. Es ist ein Säuregemisch, genannt „Caseolin", das beim Labansatz in Anwendung zu bringen sei. Das „Casol" hat gemäß seiner Bestimmung zur Beseitigung von Blähungen, zur Verbreitung von leichten Preßlern, zur Bekämpfung von Zuckeransatz usw., überhaupt zur Vergrößerung der Betriebssicherheit bereits wesentlich beigetragen. Während also das Casol einer zu reichlichen Lochbildung entgegentreten soll, soll das Caseolin die Lochung fördern. Es ist die Gebrauchsanweisung ausführlich angegeben. Erfolge sind nach Verf. bereits zu verzeichnen. Wolff (Kiel).

Fettick, Otto, Butter mit Stallgeruch und bitterm Geschmack (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 23. 1913. p. 347.)

Fettick untersuchte eine Butterprobe, die einen intensiven Stallgeruch und stark bittern Geschmack aufwies. Die bakteriologische Untersuchung ergab 1 438 000 Keime in 1 g Butter, von denen 82 Proz. Kolibakterien waren. Nachdem zur Pasteurisation des Rahmes und zur Verwendung von Milchsäurereinkulturen geschritten worden war, blieb der Fehler weg. Grimmer (Dresden).

Lang, Le Roy, A method for the improvement of buttermilk from pasteurized cream. (Univ. of Illinois Agr. Exp. Stat. Circular. 166. 1913. p. 7.)

Ordinary buttermilk from pasteurized cream is thin and watery, wheys off quickly and lacks the characteristic flavor of raw cream. This condition is improved by adding to the buttermilk 10 per cent of a skim milk culture of B. bulgaricus. Rogers (Washington).

Perotti, R., Sopra la microflora della Campagna romana. (Rendic. Accad. Lincei. Ser. 5. Vol. 20. 1911. I. Sem. p. 690—694.)

Der Keimgehalt des Bodens steigt in der römischen Campagna nach einer Bearbeitung ganz erheblich; dabei werden zuweilen bis 2 Millionen Keime pro ccm gefunden. Die höchsten Zahlen erhielt Verf. im Winter bei einer mittleren Tiefe von 30—35 cm; in trockenen Tuffböden sinkt allerdings das Maximum nach tieferen Schichten hin. Puzzlanböden enthalten meistens Bakterien, Tuffböden Pilze. Die häufigste Art ist B. fluorescens liquefaciens mit zahlreichen Abarten; an zweiter Stelle kommt Pseudomonas leuconitrophilus Perotti.

E. Pantanelli (Rom).

Rahn, Otto, Bacterial Activity in Soil as a Function on the various physical Soil Properties. (Science. Vol. 38. 1913. p. 414.[1])

B. mycoides was cultivated in quartz-sand peptone water mixtures. In one series cellulose was added to the sand. The amount of ammonia formed was taken as the indicator of bacterial activity. Bact. lactis acidi was grown in milk sand mixtures, acidity and number of cells serving as measure of development. If the data are computed per 100 grams dry soil it would seem that the bacteria thrive best in a fairly moist sand. If, however, the actual culture medium is used as basis, ammonification is most rapid in the driest soil. The concentration of the solution is of greatest importance. Results vary if peptone is given in proportion to the amount of soil or in proportion to the amount of soil moisture. The optimum thickness of moisture film for B. mycoides was between 20 and 40 microns. In arable soils with a grain size of not more than 0.1 mm. it would require more than 50 per cent of moisture to produce the optimum film thickness. Strictly aerobic bacteria will never find optimum conditions in soils. The ultimate endpoint of decomposition was the same in the case of B. mycoides, since only the rate of decomposition was influenced by the efficiency of the oxygen supply. The behavior of B. lactis acidi (anaerobic) was in accordance with the above mentioned principles, the main factor for development being a thick moisture film. Heinemann (Chicago).

Sullivan, M. X., The Origin of certain organic Soil Constituents. (Science. Vol. 38. 1913. p. 414.)[2])

Penicillium glaucum was grown in Raulin's solution and the mold and filtered solution analysed after mold growth. In the alcoholic soda extract were found aleic acid and palmitic acid and a fatty acid melting at 54° C., hypoxanthine, guanine, adenine, histidine, thymine, choline, probably lysine and a small amount of hydroxyfatty acids. In the direct alcohol extract was found mannite, cholesterol bodies, hypoxanthine and cerebroside. Most of these compounds have been found in soil and the conclusion is drawn that in the formation of soil constituents, microorganisms such as yeasts, bacteria and molds play important parts.

Heinemann (Chicago).

Kaserer, H., Versuche über Bodenmüdigkeit. (Vortrag, gehalten gelegentlich der 85. Vers. deutscher Naturf. u. Ärzte in Wien 1913.)

Die Versuche K.s beschäftigen sich vornehmlich mit der Lein- und Erbsenmüdigkeit. Es ergab sich, daß bei wiederholtem Anbau dieser Pflanzen „Keimmüdigkeit" eintritt, bei welcher die Samen durch Bakterien im Boden zum Faulen gebracht werden, bevor oder während sie keimen. Verschieden hiervon ist die „Wachstumsmüdigkeit“, die bei Lein beobachtet wurde. In gesunder Erde gezogene Pflänzchen wuchsen z. B. kümmerlich, wenn dem Boden etwa 15 Proz. „leinmüde“ Erde, in der früher Lein gewachsen war, zugefügt wurden. In ähnlicher Weise wirkte auch ein reichlicher Zusatz von Leinstroh (nicht von anderem Stroh) ungünstig auf die Entwicklung des Leines ein. Während die Keimmüdigkeit bald, z. B. über Winter, verschwinden kann, hält sich die Wachstumsmüdigkeit längere Zeit. Durch weitere Versuche soll entschieden werden, ob die Wachstumsmüdigkeit ebenso wie die Keimmüdigkeit eine Organismenwirkung ist oder ob sie durch Giftstoffe, welche die Pflanze ausscheidet und die auch im eigenen Stroh enthalten sein können, veranlaßt wird. (Nach Chemiker-Zeitung 1913. No. 116.)

---

[1] Vgl. diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 38. p. 484; Bd. 40. p. 166.

[2] Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 40. p. 171.

Vogel (Bromberg).

Schulz, Konrad, Die Verbreitung der Bakterien im Waldboden. [Inaug.-Diss.] Jena 1913.

Verf. hat Keimzählungen in Waldböden verschiedener Art aus der Umgebung von Eisenach vorgenommen. In der dortigen Gegend kommt Wald auf Kalk, Buntsandstein und Rotliegendem vor, die Untersuchungen beziehen sich daher auf diese Bodenarten. Als Nährsubstrat wurde für gewöhnlich Nährgelatine benutzt, die Entnahme der Bodenproben geschah unter Einhaltung der erforderlichen Kautelen in einfacher, näher beschriebener Weise.

Verf. erkennt die Schwächen der Plattenzählmethode an, meint aber, daß sie doch eine erste Orientierung über die bakterielle Beschaffenheit des Bodens gestattet. Er hat aber selbst die Erfahrung machen müssen, daß bei Anwendung dieses Verfahrens Zufälligkeiten und Unregelmäßigkeiten die Resultate völlig entstellen können. So waren verschiedentlich aus den höheren Verdünnungen mehr Kolonien entwickelt, als aus den zehnfach „konzentrierteren“ Ausgangsflüssigkeiten.

Im allgemeinen erwies sich der Waldboden als sehr arm an Bakterien. Die Zahlen schwankten in den oberen Schichten zwischen 2700 und einigen Hunderttausend. Aus diesem Grunde erscheint es Verf. wahrscheinlich, daß an den im Waldboden sich vollziehenden wichtigeren Umsetzungen höhere Pilze stark beteiligt sind. Ferner ergab sich:

Der Humus des Waldbodens bildet ein ungünstiges Substrat für die Bakterien.

Das Maximum der Keimzahl liegt nicht in einer bestimmten Tiefe des Waldbodens, sondern richtet sich nach der Dicke der Humusschicht und nach dem Grade der Verwitterung des Bodens. Die 5—10 cm dicke Bodenschicht, die auf den Humus folgt, ist in der Regel die bakterienreichste.

Eine Grasdecke auf dem Waldboden begünstigt das Wachstum der Bakterien an der Oberfläche.

Pilze waren nur in den obersten Schichten bis zu 15 cm herab nachzuweisen. Es scheinen sich im Waldboden drei Schichten deutlich zu unterscheiden:

1. Die oberflächliche Schicht, in welcher höhere Pilze in großer Zahl, Bakterien wenig vorkommen.

2. Die Schicht der mit Saugwurzeln durchsetzten Erde. Hier finden wir die Mykorhiza-Pilze. Die anderen Pilze treten an Zahl zurück, Bakterien sind nur in geringer Menge vorhanden.

3. Die vorwiegend mineralische Erde. Sie ist frei von höheren Pilzen

und bildet das eigentliche Reich der Bodenbakterien, deren Zahl nach der Tiefe hin rasch abnimmt. Vogel (Bromberg).

Bail, O. u. Breinl, F., Versuche über das seitliche Vordringen von Verunreinigungen im Boden. (Arch. f. Hyg. Bd. 82. 1914. H. 1.)

Obiges, hygienisch sehr wichtiges Thema tritt dann in Erscheinung, wenn z. B. undichte Senkgruben oder ein schadhafter Kanal ihre Durchsickerungen in und auf den umgebenden Boden und damit sehr leicht in Brunnenanlagen eindringen lassen. — Schwierig ist schon die Konstatierung eines derartigen Falles, aber noch schwieriger ist es, planmäßige Untersuchungen darüber anzustellen. — In einem günstigen Falle waren die Verf. in der Lage, sich Einblicke verschaffen zu können, nachdem sie aus der Literatur ersehen hatten, daß das Fortschreiten einer einsickernden Flüssigkeit bei senkrechtem Auftreffen auf den Boden bekannt ist, daß aber Seitwärtsbewegen einer solchen noch aufgeklärt werden muß.

Die Verf. zeigen zunächst die Untersuchungsarten anderer Autoren und machen dann mit ihrer Versuchsanordnung bekannt, wobei auf p. 37 erhaltene Zahlenresultate angegeben werden. Hier ist ersichtlich, daß das Fortschreiten der Verunreinigung im Schnitte in einer Kurve erfolgt, welche sich von der Einlaufstelle her geradlinig fortsetzt und gleichzeitig nach unten senkt. Genaue Angaben über die seitliche Ausbreitung der Verunreinigung waren hierbei noch nicht zu erzielen. Festgestellt wurde aber bezüglich der Verbreitung von Bakterien, daß den geringen hier verwendeten Bodenschichten eine stark filtrierende Kraft zukommt, da der Keimgehalt des abgeflossenen Wassers gegenüber dem Einlaufgehalte sehr zurückgegangen war. Am Boden des benutzten Apparates hatte sich durch mangelhaften Abfluß eine Art Grundwasser gebildet, das einen zwar verringerten, aber immerhin noch hoch bleibenden Keimgehalt zeigte. — Geänderte Versuchsanordnung (p. 41—42) ergab, daß die Filtrationsfähigkeit des Bodens und die Zurückhaltung der eingeflossenen Bakterienmengen eine unerwartet starke war. Auch wurde hierbei festgestellt, daß die Bakterienabnahme viel stärker ist, wenn das Wasser einen längeren horizontalen oder schiefen Weg im Boden zurücklegen muß, wobei nur wenige Keime weiter transportiert werden können und ferner, daß der langsame Flüssigkeitstransport gleichfalls auf Bakterien zurückhaltend wirkt. Weitere, mit größeren Erdmengen und seitlichem Einlauf ausgeführte Versuche, welche durch ihre Quantität der in Wirklichkeit vorkommenden Lage entsprechen, ergaben bei ungehindertem Abflusse nach unten, daß die seitliche Ausbreitung der Verunreinigung keine allzu bedeutende ist. Ist aber der Abfluß gehindert, wie z. B. durch eine mehr oder minder impermeable Bodenschicht, dann findet sofort eine Ausbreitung der Verunreinigung statt, deren Folgen sich ermessen lassen. Es liegt somit die Gefahr weniger in der rein seitlichen Verunreinigung als in der unverhältnismäßigen Ausbreitung in der tieferen Bodenschicht. Nach mehrfach geänderter Versuchsanordnung ergab sich als Schlußsatz, daß die Hauptgefahr nicht in der seitlichen, sondern in der nach unten gehenden Infiltration des Bodens liegt. Rullmann (München).

Jones, Dan H., A cultural and morphological Study of some Azotobacter. (Science. Vol. 38. 1913. p. 413.)[1]

---

[1] Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 38. p. 14.

From various samples of soil 16 colonies of Azotobacter were isolated. Four varieties were distinguished. These have been named A 1, A 2, A 3, A 4. A 1 and A 2 resemble Azotobacter chroococcum and A 3 and A 4 resemble Azotobacter agilis, as described by Beijerinck. All cultures in Ashby's solution fix atmospheric nitrogen. In young culture the organisms is a short thick rod with rounded ends, frequently occurring in pairs and is motile. At this stage the protoplasm is homogeneous, though sometimes a sperical granule like a nucleus is present. When cultures are 4 to 5 days old the cells become irregularly spherical, coarsely granular and nonmotile, Granules are often of two kinds. The one kind gives the glycogen reaction with iodin-potassium-iodid, but is negative to certain anilin dyes. The other kind is negative to the glycogen reaction, but positive to the anilin dyes. The second kind of granule seems to arise from the nuclear body. The first kind appears to be a product of the cell activity and is possibly a reserve food dupply. The granules of the second type seem to give rise to new organisms. Those of the first type are slowly dissolved. At this stage A 1 and A 2 produce large capsules. After about three weeks the majority of the organisms appear as spheres, A 1 and A 2 in irregular clusters, A 3 and A 4 in fairly regular packets. Chains of from 4 to 30 cells are common in old liquid cultures. Involution forms of great variety are common in old cultures. Ashby's media give the best growth, beef extract media allowing but restricted development. There is good growth on Loeffler's blood serum. Heinemann (Chicago).

Ehrenberg, Paul, Zur Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau. (Fühlings landw. Ztg. 1913. p. 449—462.)

Verf. sucht es wahrscheinlich zu machen, daß zur Deckung des Stickstoffbedarfs der Ernten in dem bekannten, von Julius Kühn begonnenen Roggenanbauversuch auf dem Versuchsfelde der Universität Halle, die aus der Atmosphäre in den Boden gelangenden Stickstoffquantitäten völlig ausreichen, so daß die Annahme einer beträchtlicheren Stickstoffsammlung unnötig erscheint. Die durch das Regenwasser dem Boden zugeführten N-Mengen sind allerdings nach neueren einwandfreien Untersuchungen nur gering, man wird im allgemeinen nur mit etwa 3—6 kg pro Jahr und Hektar rechnen können, während die Hallenser Roggenernten dem Boden jährlich ca. 30 kg N/ha entnehmen. Jene geringen Mengen für die N-Zufuhr durch die Niederschläge gelten jedoch nur für das freie Land oder für die Umgebung kleiner Ortschaften, und Verf. sucht nun in längeren Ausführungen nachzuweisen, daß das inmitten der industriereichen Großstadt Halle gelegene Versuchsfeld eine so erhebliche Mehrzufuhr an N durch die Niederschläge erhalte, daß der N-Bedarf der Roggenernten zum großen Teil aus dieser Quelle gedeckt werden könne. Er glaubt hierbei Halle auf eine Stufe mit Leeds in Yorkshire stellen zu können, für welche Stadt Crowther und Ruston einen N-Gehalt der jährlichen Niederschläge von 15,57 kg pro ha ermittelt haben. Verf. macht nun folgende Berechnung:

In der Ernte sind dem Boden entzogen fürs Jahr und Hektar . .	29,26 kg
Davon stammen aus dem Saatgut	2,64 kg
Durch die Niederschläge sind zugeführt worden	15,57 kg
Zusammen N-Zufuhr von außen	18,21 kg.

Die N-Auswaschung ist gegen die N-Absorption aus der Luft aufgerechnet, kommt also nicht in Abzug. Demnach bleiben durch N-Zufuhr von außen ungedeckt: 11,05 kg.

Diese geringe Menge dürfte zum größeren Teile dem N-Vorrate des Bodens entstammen, so daß auf alle Fälle die Zufuhr durch N-sammelnde Bakterien nur einen Bruchteil dieser 11 kg ausmachen könnte, praktisch also bedeutungslos wäre. Ganz abgesehen aber nun davon, daß die dem Ehrenbergschen Erklärungsversuche zugrunde gelegte Übereinstimmung zwischen Halle und Leeds keineswegs als erwiesen gelten kann, muß eine solche Deutung naturgemäß auf den Einzelfall „Halle“ beschränkt bleiben und berührt die andernorts gemachten ähnlichen Beobachtungen in keiner Weise. Auch Ref. verfügt über einen auf dem Bromberger Versuchsfelde ausgeführten, nunmehr siebenjährigen Versuch, bei welchem auf humosem, schwach lehmigem Sandboden Pflanzenbau ohne jede N-Zufuhr getrieben wird, und bei welchem in guter Übereinstimmung mit den an anderen Orten erhaltenen Werten bisher pro Jahr und Hektar durchschnittlich 30—35 kg N in den Ernten entnommen wurden.

(Am Schlusse seiner Ausführungen gibt Verf. dem Wunsche Ausdruck, daß die weiteren Auseinandersetzungen über die N-Sammlung im Boden frei von persönlichen Angriffen sein möchten. Er selbst handelt jedoch kaum im Sinne dieses Wunsches, wenn er schon in dem folgenden Satze bedauert, daß ein von Löhnis verfaßtes Referat über Pfeiffers „Stickstoffsammelnde Bakterien, Brache und Raubbau“ nichts weiter als eine Ansammlung von Schmähungen darstelle, ohne gleichzeitig zum Ausdruck zu bringen, daß dieses Referat nur ein Echo war auf den unnötig scharfen Vorstoß Pfeiffers[1]) gegen Löhnis. Ref.) Vogel (Bromberg.)

Lemmermann u. **Fresenius,** Beitrag zur Frage der Ammoniakverdunstung aus Böden. (Landw. Jahrb. 1913. p. 127—154.)

Verf. hatten bei früherer Gelegenheit festgestellt, daß die Verflüchtigung des kohlensauren Ammoniaks aus Böden durch Zusatz von $CaCO_3$ einmal verringert, ein anderes Mal gesteigert wurde, während bei manchen Böden der Kalkzusatz ohne jede Wirkung blieb. Die Versuche wurden unter Verwendung von sechs verschiedenen Böden fortgesetzt und erweitert. Es zeigte sich wiederum, daß der Zusatz von $CaCO_3$ das Absorptionsvermögen der Böden für Ammoniak in ganz verschiedener Weise beeinflußt. Teils wurde die Ammoniakverdunstung verringert, teils war das Gegenteil eingetreten, in einem Marschboden blieb der Kalkzusatz ohne Einfluß. Bei einigen der Böden war die Einwirkung des $CaCO_3$ je nach der Höhe der Stickstoffgabe verschieden, sie konnte eine vollständige Umkehrung erfahren, in anderen Fällen wirkte die Kalkung stets in der gleichen Richtung.

Um einen weiteren Einblick in die hier vorliegenden eigentümlichen Absorptionsverhältnisse zu erhalten, wurde eine möglichst umfassende Charakterisierung der verwendeten Böden vorgenommen durch Bestimmung des Humusgehaltes, des Gehaltes an abschlämmbaren Teilen, der Azidität, der Hygroskopizität und des Gehaltes an Kalk und Magnesia. Die dabei benutzte Methodik wird im einzelnen genau beschrieben. Gleichzeitig wurde festgestellt, daß die Ammoniakabsorption in allen sechs Böden in der Hauptsache auf chemische Wirkung (Basenaustausch) der zeolithartigen Verbindungen zurückzuführen ist, daß eine Festlegung durch kolloidale Bestandteile also kaum in Frage kommt.

Die bei der Untersuchung der Böden erhaltenen Resultate ergaben nun mancherlei Beziehungen zu dem verschiedenartigen Verhalten des Kalkes in bezug auf die Ammoniakverdunstung. Wo der Kalkzusatz eine Zunahme der Ammoniakverdunstung bewirkt hatte, dürfte wohl eine merkliche Herabsetzung der Azidität und damit eine geringere Festlegung von Ammoniak durch die Bodensäuren bewirkt worden sein. Vielleicht hat auch eine Koagulation kolloidaler Bestandteile zu einem solchen Effekt der Kalkung mit beigetragen. In den entgegengesetzten Fällen, wo der $CaCO_3$ günstig wirkte sind wahrscheinlich neue, absorptionskräftige, zeolithische Verbindungen entstanden. Jedenfalls scheint auch die Menge des austauschbaren Kalis von Einfluß auf die Wirkung des Kalkes bei der Festlegung des Ammoniaks zu sein. Vogel (Bromberg).

---

[1]) a. a. O. p. 11.

Vogel, J., Bemerkung zu meinen Beobachtungen über das Verhalten von Nitrat im Ackerboden. (Die landw. Vers.-Stat. Bd. 82. 1913. p. 159.)

Die in den landwirtschaftlichen Versuchsstationen (Bd. 78. p. 265) und auch in dieser Zeitschrift (Bd. 34. p. 540) publizierten Befunde bedürfen einer wesentlichen Einschränkung. Es stellte sich nämlich heraus, daß die verwendeten Porzellanschalen mit einer Glasur versehen waren, welche die Eigenschaft besaß, mehrere Tage mit ihr in Berührung befindliche salpetersaure Salze aufzunehmen und so festzuhalten, daß sie auch durch energischste Behandlung der Schalen mit kochend heißem Wasser nicht wieder vollständig herausgewaschen werden konnten. Erst wenn solche Schalen, mit Wasser gefüllt, längere Zeit aufbewahrt wurden, erfolgte ein allmählicher Übergang des in der Glasur und dem Schalenmateriale festgehaltenen Nitrates in das Wasser, und so erklärt sich die zuweilen in den „Begleitwässern“ festgestellte Salpetersäure. Die gelegentlich nachgewiesene salpetrige Säure deutet darauf hin, daß sich unter Umständen auch Reduktionsvorgänge in der Porzellanmasse abspielten. Die Aufnahme der Nitrate durch die Glasur der Schalen wurde durch die gewählten Versuchsbedingungen — Aufbewahrung der Proben in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre — und durch das häufiger vorgenommene Erhitzen im Dampfstrome noch begünstigt. Die abnorm hohen Stickstoffverluste, die stets durch ihre außerordentliche Unregelmäßigkeit auffielen, sind auf dieses Verhalten der Porzellanschalen zurückzuführen und können daher nicht aufrecht erhalten werden. Unaufgeklärt bleibt vorläufig noch die zuweilen beobachtete stark alkalische Reaktion der Erden, in welchen Stickstoffverluste eingetreten waren, und der gelegentliche Befund von salpetriger Säure in dem an den Glasglocken niedergeschlagenen Kondenzwasser. Als richtig, und in zahlreichen Nachuntersuchungen bestätigt, bleibt bestehen, daß auch in flachen Bodenschichten, besonders bei Verwendung humusreicher, leichterer Bodenarten, Stickstoffverluste eintreten, die unter Umständen schon nach wenigen Tagen 10—12 Proz. des zugesetzten Salpeterstickstoffs ausmachen. Eine solche Abnahme an Nitratstickstoff tritt nur in frischen, nicht sterilisierten Erden ein und beruht offenbar auf Denitrifikation, da eine durch Salpeterassimilation zu erklärende Zunahme des Bodenstickstoffs nie mit Sicherheit erwiesen werden konnte. Eher traten bei den zahlreichen in dieser Richtung angestellten Versuchen geringe Abnahmen des ursprünglichen Bodenstickstoffs ein. Eine Spaltung des Nitrates auf chemischem Wege findet nicht statt. Autoreferat.

Wiegner, Georg, Die Festlegung des Stickstoffs durch sogenannte Zeolithe. (Journ. f. Landw. 1913. p. 11—56.)

Die Art der Festlegung von Stickstoff im Boden durch Zeolithe ist durch die bisher vorliegenden Arbeiten noch nicht völlig geklärt worden. Verf. suchte daher erneut zu entscheiden, ob die von den Zeolithen im Boden absorbierten Ammoniakmengen so fest gebunden sind, daß sie wenigstens zum Teil über die Dauer einer Vegetationsperiode hinaus für die Pflanzenwurzeln unzugänglich bleiben.

Frühere Versuche hatten gezeigt, daß beim Zusammenbringen wäßriger Ammoniaksalzlösungen mit amorphen wasserhaltigen Silikaten ein Austausch zwischen den Kationen der Lösung und den Basen im Zeolith stattfindet derart, daß ein Teil der Kationen der Lösung in die feste Phase übertritt und „festgelegt“ wird. Dieser Anteil ist prozentisch um so geringer, je höher die Konzentration der Salzlösung ist. Die Festlegung durch Zeolithe erfolgt nicht etwa so, daß dauernd ein konstanter Teil des Stickstoffes vollkommen der Lösung entzogen wird, sondern so, daß sich ein leicht verschiebbares Gleichgewicht zwischen den Ionen der Lösung und den Basen im Bodenkörper einstellt.

Zu den Vegetationsversuchen, welche in reinem Sand ausgeführt wurden, diente ein Calciumpermutit nach Gans. Der Stickstoff wurde teils in Form eines in näher beschriebener Weise hergestellten Ammoniumzeoliths, teils als Ammoniumsulfat zugegeben. Aus den erhaltenen Ergebnissen sei an dieser Stelle nur mitgeteilt, daß die Zugabe von Calciumzeolith ertragssteigernd auf die Trockensubstanzernten von Hafer als Vorfrucht und Buchweizen als Nachfrucht wirkte. Die gesamte Stickstofferntewurde durch die Zugabe von Zeolith weder für die Vorfrucht, noch für die Nachfrucht vermindert, eher trat eine geringe Mehrernte ein, die aber eventuell durch die geringen Unterschiede im Stickstoffgehalt der Düngung erklärt werden könnte.

Vogel (Bromberg).

Kappen, H., Die katalytische Kraft des Ackerbodens. (Fühlings landw. Ztg. 1913. p. 377—392.)

Die Arbeit beschäftigt sich vornehmlich mit der Wasserstoffsuperoxydkatalyse durch Ackerboden. Unter Benutzung der von Bredig und seinen Schülern (Teletow, Senter) ausgearbeiteten Methodik konnte festgestellt werden, daß es sich bei der Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd durch Boden um eine Reaktion 1. Ordnung handelt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also der jeweiligen Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds proportional. Bemerkenswerte Unterschiede zwischen dem Verlaufe der Katalyse des Wasserstoffsuperoxyds durch Ackerboden und durch andere, chemisch wohl definierte Katalysatoren bestehen nicht.

Eine starke Verminderung seiner Befähigung zur Wasserstoffsuperoxydzerlegung erfährt der Boden beim Sterilisieren durch Hitze. Demgegenüber bewirkte die Behandlung des Bodens mit chemischen Desinfektionsmitteln, insbesondere mit Phenol und Formalin, keine nennenswerte Veränderung seiner katalytischen Kraft. Die schädigende Wirkung des Erhitzens dürfte daher wohl auf eine Oberflächenveränderung der Bodenkolloide zurückzuführen sein, jedenfalls sind Enzyme und Mikroorganismen an diesen Vorgängen nicht beteiligt. Da die Behandlung des Bodens mit den genannten chemischen Desinfizientien ohne Einfluß auf seine katalytischen Fähigkeiten bleibt, so vermutet Verf., daß diese Mittel den Boden auch in sonstiger Beziehung chemisch und physikalisch ziemlich unverändert lassen werden. Daher wird das Studium einer Reihe wichtiger mikrobiologischer Fragen

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

in derartig keimfrei gemachten Böden zu einwandsfreieren Resultaten führen, als in hitzesterilisierten und dabei erheblich veränderten Böden.

Vogel (Bromberg).

Kappen, H., Die Katalyse des Cyanamids und ihre Bedeutung für die Landwirtschaft. [Habilit. Schr.] 119 pp. Jena 1913.

Der Entwicklungsgang der Anschauungen über die Kalkstickstoffzersetzung im Ackerboden wird eingehend dargelegt. Nachdem erkannt war, daß eine ganze Reihe von Bodenkolloiden zu einer teilweise überaus energischen Cyanamidkatalyse befähigt sind, konnte die bis dahin auch vom Verf. vertretene Auffassung einer rein mikrobiellen Zerlegung des Kalkstickstoffs nicht aufrecht erhalten werden.

Eine größere Anzahl künstlich hergestellter Metalloxyde und -hydroxyde wurden auf ihre Befähigung zur Cyanamidspaltung geprüft. Mehrere von ihnen brachten Cyanamid aus wäßriger Lösung schon nach kurzer Zeit zum Verschwinden. Diese Stoffe unterschieden sich wieder in sehr charakteristischer Weise; nur ein Teil von ihnen, nämlich Chromhydroxyd, Mangansuperoxyd, Eisenhydroxyd und Zinndioxyd zersetzten das Cyanamid unter Bildung von Harnstoff, während die anderen Stoffe eine quantitative Überführung des Cyanamids in Dicyandiamid zustande brachten. Der am stärksten wirkende Katalysator der Harnstoffbildung war Mangansuperoxyd. Die mit diesem ausgeführten Versuche werden eingehend geschildert, ebenso die bei der chemischen Untersuchung der Umwandlungsprodukte befolgte Methodik. Dabei war von Interesse, daß neben Harnstoff stets auch nicht unerhebliche Mengen von Dicyandiamid entstanden. „Vielleicht wird sich die Minderwirkung, die der Kalkstickstoff dem schwefelsauren Ammoniak und Chilesalpeter gegenüber zeigt, doch noch zum Teil auf diese Dicyandiamidbildung zurückführen lassen.“

Die Spaltung des Cyanamids in der Ackererde verfolgte Verf. im Erdversuch (nach der agrikulturchemischen Methode) und in Lösungen (im bodenbakteriologischen Umsetzungsversuch). Dabei konnten Beziehungen zwischen der Schnelligkeit der Cyanamidumwandlung und dem Gehalt der Erden an abschlämmbaren Teilen, kohlensaurem Kalk und Mikroorganismen nicht festgestellt werden. Dagegen bestand ein Zusammenhang zwischen der Umwandlungsgeschwindigkeit und dem Gehalt an organischer Substanz. In den Fällen mit starker Cyanamidzersetzung war die Schimmelpilz- und Bakterienentwicklung eine so lebhafte, daß an ihrer Mitwirkung an diesem Vorgange gar kein weiterer Zweifel bestehen kann. Nähere Auskunft über den Umfang dieser Mitwirkung kann nur durch sehr eingehendes Studium des Reaktionsverlaufs, womit Verf. noch beschäftigt ist, erlangt werden.

Die praktische Bedeutung der Cyanamidkatalyse für die Landwirtschaft besteht nun in der technischen Überführung des Kalkstickstoffs in Harnstoff, was durch Verwendung der Mangansuperoxyd enthaltenden kräftig wirkenden Kontaktsubstanzen möglich und praktisch bereits erprobt ist. In der Tatsache, daß die katalytische Umwandlung des Cyanamids in Harnstoff sich zu einem technischen Verfahren ausgestalten läßt, erblickt Verf. das Hauptresultat seiner Arbeit. Er hat daher auch das Verhalten von Harnstoff im Boden näher verfolgt. Dabei ergab sich eine weitgehende Ähnlichkeit im Verlauf der Harnstoffumwandlung und der Cyanamidkatalyse. In beiden Fällen setzt der Umwandlungsprozeß mit großer Geschwindigkeit ein, um allmählich immer langsamer zu werden. Dieses unter Verwendung eines lufttrockenen Bodens erhaltene Resultat könnte für die chemische Natur des Harnstoffzersetzungsprozesses sprechen. In drei anderen, nicht vorgetrockneten Böden war aber der Zersetzungsverlauf ein derartiger, daß sein mikrobieller Charakter als sichergestellt gelten darf. Vegetationsversuche, welche unter Verwendung eines vom Verf. aus Kalkstickstoff hergestellten Harnstoffs an verschiedenen Orten (Berlin, Harleshausen, Jena) auf verschiedenen Bodenarten ausgeführt wurden, fielen für den Harnstoff sehr günstig aus. Er brachte bei der Hauptfrucht mindestens den gleichen Mehrertrag wie Chilesalpeter, eine erkennbare Nachwirkung äußerte er allerdings nicht. Vogel (Bromberg).

Wachtel, Paul, Die Wasserstoffsuperoxydkatalyse durch Boden. [Inaug.-Diss.] Jena 1912.

Nach einer erschöpfenden Wiedergabe der auf die Wasserstoffsuperoxydkatalyse bezüglichen Literatur beschreibt Verf. seine eigenen Versuche, deren Zweck vorwiegend darin bestand, weitere Beweise für den Befund Kappens zu erbringen, daß Mikroorganismen und Enzyme an der Wasserstoffsuperoxydzersetzung im Boden unbeteiligt sind, diese vielmehr durch anorganische Bodenbestandteile hervorgerufen wird.

Es wurden zunächst Versuche über die Einwirkung von Mangansuperoxyd auf H_2O_2 angestellt, auf deren Einzelheiten an dieser Stelle nicht näher eingegangen sei. Auch wegen der Details der in mannigfachster Weise variierten Versuche mit Boden als Katalysator sei auf die Originalarbeit verwiesen. Erwähnt sei nur, daß die katalytische Kraft der Böden durch Erhitzen sehr stark beeinträchtigt und schließlich fast vollständig aufgehoben wurde. Bei Anwendung durch Hitze sterilisierter Erde kann daher nicht entschieden werden, ob die Katalyse eine Funktion der Bakterien und ihrer Enzyme oder der Bodenkolloide ist. Für solche Beobachtungen sind die Böden durch chemische Mittel, am besten wohl durch Formalin, von lebenden Mikroben zu befreien.

Die gesamten Ergebnisse faßt Verf. in folgender Weise zusammen:

1. Die wesentlichsten katalytischen Bestandteile des Bodens sind seine Tonkolloide, wobei die Basizität des Bodens, insbesondere sein natürlicher Kalkgehalt, die katalytische Wirkung fördert, Azidität des Bodens sie hemmt.
2. Humusreiche, aber tonarme Böden erwiesen sich bezüglich der katalytischen Kraft nicht höher als die sandigen Lehmböden.
3. Die Versuche mit Phenol, Formaldehyd und Cyankalium beweisen, daß die katalytische Kraft der Kalktonböden auch nach Abtötung der Organismen unvermindert weiterbesteht.
4. Säuren und saure Salze wirken hemmend, Alkalien bis zu mittleren Konzentrationen stark fördernd auf die Katalyse durch Boden ein.
5. NaCl wirkt in starker Verdünnung überhaupt nicht wesentlich, KCl dagegen anscheinend etwas fördernd auf die Katalyse durch Boden ein.
6. KCN fördert die katalytische Wirkung des Bodens auf H_2O_2 ganz bedeutend. Eine Absorption der CN- oder OH-Ionen bei KCN-Zusatz läßt sich jedoch nicht nachweisen.
7. Künstlich hergestelltes kolloidales Aluminiumhydroxyd katalysiert H_2O_2 nicht. Vogel (Bromberg).

Beckwith, T. D., Soil Inoculation under Soil Conditions of Lime Deficiency. (Science. Vol. 38. 1913. p. 414.)[1])

---

[1]) Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 40. p. 171.

During the past summer 110 tests were made by inoculating soil deficient in lime. Sixty of these were inoculated with alfalfa and 69 per cent of these were successful. Fifty tests carried on in another part of the state showed 90 per cent successful results. The author concludes that B. radicicola may retain virulence to the roots of legume plants under conditions of small amount of soil acidity. Results were unfavorable when lime deficiency was over 5 tons per acre-foot. P. G. Heinemann (Chicago).

Ramm, Zur Frage der Impfung bei Neukulturen auf Hochmoor. (Illustr. landw. Ztg. 1913. No. 66.)

Auf neu umgebrochenem Hochmoor gedeihen Leguminosen nur dann freudig, wenn geeignete Knöllchenbakterien in Form von Impferde oder Reinkulturen zugeführt werden. Die Impfverfahren sind nun bei umfangreichen Neukulturen, wenn an einer Stelle in einem Jahre Hunderte von Hektaren kultiviert werden sollen, mit großen Schwierigkeiten verbunden. Um diesen zu begegnen, ist auf dem Wiesmoor schon seit mehreren Jahren versucht worden, die Neusaaten durch Düngung mit Chilesalpeter (200 kg pro ha) zu kräftigen, und zwar mit sehr gutem Erfolge. Besonders auffallend und wichtig ist hierbei, daß sich schon 8—14 Tage nach dem Auflaufen der stickstoffgedüngten Pflanzen ein reicher Knöllchenansatz an den Wurzeln zeigt. Auf Flächen, die nicht geimpft und nicht mit Stickstoff gedüngt wurden, zeigt sich der Knöllchenbesatz der Wurzeln erst sehr viel später, etwa nach Verlauf von 8 Wochen. „Damit ist also erwiesen, daß die Knöllchenbakterien sich einfinden, sobald man dafür sorgt, daß die Pflanzen nach dem Aufzehren der Reservestoffe des Samens leichtlösliche Stickstoffnahrung vorfinden.“ Verf. meint, daß infolge der Zuführung leicht aufnehmbaren Stickstoffs die Wurzeln schneller das Entwicklungsstadium erlangen, in welchem sie fähig sind, die Bakterien aufzunehmen und Knöllchen zu bilden. Er hält es mit Recht für wünschenswert, daß diese wichtigen Beobachtungen durch wissenschaftliche Untersuchungen ergänzt und erklärt werden.

In der Praxis ist die Stickstoffdüngung weniger umständlich und erheblich sicherer als die Impfung. Vogel (Bromberg).

Heinze, B., Einige weitere Beiträge zur Kultur der Leguminosen mit besonderer Berücksichtigung der Stickstoffernährung. (Jahresber. d. Vereinig. f. angew. Botan. 10. [1912]. 1913. p. 75—114.)

Die Arbeit rollt die ganze Leguminosenfrage auf. Es können hier unmöglich alle Einzelheiten erwähnt werden, nur auf einige Hauptpunkte sei hingewiesen.

Wichtig für die Entscheidung mancher Fragen ist die „Verwendung solcher Leguminosen als Versuchspflanzen, welche im allgemeinen beim ersten Anbau auf bestimmten Böden keinerlei Knöllchen bilden“ (Seradella, Lupine, Esparsette, Sojabohne; letztere liefert allerdings kaum keimfähige Samen). Als Boden kommt hierfür besonders Neuland in Frage. Die Aufnahme von Boden-N und von elementarem Luft-N ist nicht einseitig überwiegend, sondern beide Prozesse laufen nebeneinander her, wenn auch nach den jeweiligen äußeren Bedingungen in verschiedenem Verhältnis. Auch bei reichlicher Knöllchenbildung in N-armem Boden zeigen die Versuchspflanzen kümmerliche Entwicklung. Umgekehrt entwickeln sie sich sehr gut bei reichlicher N-Ernährung, aber fehlender Knöllchenbildung. Boden-N wird „auch von

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

den Leguminosen keineswegs nur als Salpeter, sondern zum Teil auch als Ammoniakstickstoff und aller Wahrscheinlichkeit nach sogar auch als Amidstickstoff aufgenommen.“ Auch der N von Azobaktermaterial kann ebenso wie von anderen Pflanzen ausgenutzt werden. Bei wiederholtem Leguminosenanbau dürfte bereits der zweite Anbau auch ohne Impfung erfolgreich sein, da die Knöllchenbildung beim zweiten Anbau nicht erst nach dem Verrotten der alten Pflanzen (etwa Jahresfrist), sondern bereits nach 8—10 Wochen eintritt. Unverträglichkeit der Knöllchenbakterien von Rotklee zu Lupine, Seradella oder umgekehrt, konnte nicht festgestellt werden, höchstens bei auffallendem Kalkmangel. Verf. steht auch auf dem Standpunkt, daß vorläufig die Knöllchenbakterien der verschiedenen Leguminosen als eine Art zu betrachten sind.

Besprochen werden ferner Bodenmüdigkeit, Einfluß von Kalk, Kali, Phosphor. Zum Schluß wird die Brauchbarkeit der verschiedenen Impfstoffe besprochen. Rippel (Augustenberg).

Grignan, L'inoculation de bactéries nitrifiantes dans le sol. (Revue hortic. Année 85. 1913. p. 554—555.)

G. signale les résultats obtenus par le professeur Bottomley pour réussir l'inoculation de bactéries nitrifiantes. Il ne faut pas employer des cultures liquides, mais des cultures sur tourbe stérile dont l'acide humique a été transformé en humates par action microbienne. Cette tourbe est ensemencée avec Azotobacter chroococcum et Bacillus radicicola. On a constaté l'enrichissement en azote du sol et des récoltes plus abondantes. H. Kufferath (Bruxelles).

Fischer, H., Die Bakterienimpfung zu Leguminosen. (Gartenflora Bd. 62. 1913. p. 42—43.)

Auf Kulturland scheint in der Regel eine Impfung mit Knöllchenbakterien keinen Erfolg zu zeitigen, da dasselbe die in Frage kommenden Bakterien bereits enthält. Verf. beobachtete auf dem Versuchsfelde der Agrikulturchemischen Station zu Dahlem, daß die Pflanzen der ungeimpften Kontrollbeete ebenso reichlich Knöllchen angesetzt hatten und ebenso gut im Wuchs standen, wie die nach verschiedenen Methoden geimpften Pflanzen. Obwohl es sehr leichter Boden war und obwohl er seit mindestens sieben Jahren keine Leguminosen getragen hatte, waren doch die spezifischen Bakterien darin enthalten und lebenskräftig genug, um eine Impfung überflüssig zu machen. Es waren sowohl Lupinen- als auch Erbsenbakterien im gleichen Boden vorhanden.

Bisweilen haben aber Impfungen auch auf Kulturland noch sichtlichen Erfolg gehabt. Es empfiehlt sich also, eine Probeaussaat auf dem fraglichen Boden zu machen.

Am besten arbeiten Knöllchenbakterien, die von der gleichen Leguminosenart stammen; gegenseitig infektionsfähig sind aber auch die Bakterien der Gattungen Lupinus und Ornithopus; sehr wenig gegenseitig wirksam sind Vicia und Trifolium.

Herter (Berlin-Steglitz).

Mielck, Otfried, Die Wirkungen der Gründüngung. (Fühlings landw. Ztg. 1913. p. 585—612.)

Die Arbeit bringt eine sehr gute und vollständige Übersicht über die hauptsächlichsten Ergebnisse der bisher ausgeführten exakten Gründüngungsversuche. Die verschiedenen Wirkungen der Gründüngung werden in getrennten Abschnitten — Stickstoffwirkung und Nebenwirkungen — zusammenhängend dargestellt, alsdann folgt noch ein kurzer Bericht über eigene Beobachtungen des Verf.

Er hat verschiedene Gründüngungspflanzen, die für Stoppelfruchtbau in Betracht kommen, auf dem Poppelsdorfer Versuchsfelde hinsichtlich ihrer Entwicklungsintensität (Beschattung, Trockensubstanz- und Stickstoffertrag) und der Bewurzelungsverhältnisse untersucht. Im Wurzeltiefgang waren keine erheblichen Unterschiede vorhanden, die erreichten Tiefen waren durchschnittlich nicht höher, als bei dem voraufgegangenen Roggen. Besondere Unterschiede zwischen Leguminosen und Gramineen scheinen in dieser Beziehung also nicht zu bestehen. In Tiefen über 80 cm verliefen alle Wurzeln in dem schwer durchlässigen Lehmboden nur noch in Wurmkanälen, diese sind es daher, die den tieferen Untergrund erschlossen haben. Die Wurzelverbreitung war am stärksten bei 25 cm Tiefe und nahm dann erheblich ab.

Im Ertrage stand die Saatwicke an erster Stelle, ebenso in der Stärke der Bewurzelung. Ihr folgten Wintererbse, Viktoriaerbse und Peluschke. Diese Pflanzen würden demnach unter den gegebenen Verhältnissen in erster Linie als Stoppelfruchtgründüngung in Betracht kommen. Lupinen mußten aus dem Versuche ausgeschieden werden, da sie infolge Fehlens gut angepaßter Knöllchenbakterien sichtbar an Stickstoffmangel litten und sich nur kümmerlich entwickelten. Vogel (Bromberg).

v. Seelhorst, unter Mitwirkung von **Müther, Mayer, Bothe, Haas, Ohlmer,** Graf **Rostworowski** und **Sinz,** Der Verbleib des Gründüngungsstickstoffs im Sandboden auf Grund von Vegetationsversuchen. (Arb. d. Deutschen Landw. Gesellsch. H. 241. 1913.)

Die umfangreichen, auf eine Reihe von Jahren sich erstreckenden Versuche sind durch den Umstand angeregt worden, daß im allgemeinen eine verhältnismäßig geringe Menge des Gründünger-N auf Sandboden in den nachfolgenden Ernten gewonnen wird, ein großer Teil daher verloren geht. Es sollte entschieden werden, wo dieser in Verlust geratene N verbleibt. Es lagen vier Möglichkeiten vor:

1. Die Auswaschung.
2. Zerstörung durch Denitrifikation und Abgabe von Ammoniak an die Luft.
3. Unlöslichwerden in den Resten der organischen Substanz.
4. Festlegung in Eiweißstickstoff.

Da es sich als unmöglich erwies, geringe Schwankungen im N-Gehalte des Bodens mit Sicherheit nachzuweisen, mußte von der genauen Feststellung der etwa durch Denitrifikation oder Festlegung den Pflanzen entzogenen N-Mengen abgesehen und die Versuche auf die Ermittelung des durch Auswaschung in Verlust geratenen N beschränkt werden.

Die Vegetationsversuche sind in fahrbaren eisernen Kästen (Lysimetern) von 1 qm Querschnitt und 1,38 m Tiefe unter möglichst natürlichen Bedingungen ausgeführt worden, der Versuchsplan gestaltete sich folgendermaßen (s. Tabelle p. 288).

Da über die Ergebnisse der einzelnen Versuchsjahre in dieser Zeitschrift regelmäßig berichtet worden ist[1], so sei nur das Wichtigste aus dem Gesamtergebnis der im Jahre 1904 begonnenen und mit der Ernte des Jahres 1910

---

[1] Bd. 20. p. 173 u. 300; Bd. 22. p. 446; Bd. 26. p. 458; Bd. 29. p. 237.

Jahr	Kasten													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	1904—1907 Gründüngung mit Lupinen (1907 Erbsen)												1904 Gerste	1904 Brache
	tief untergebracht						flach untergebracht							
	Frühjahr		Herbst				Frühjahr		Herbst					
1905—1908	Kartoffeln	Gerste	Kartoffeln	Roggen	Kartoffeln	Roggen	Kartoffeln	Gerste	Kartoffeln	Roggen	Kartoffeln	Roggen	Roggen	Brache
1908—1909	Roggen													Brache
1909—1910	italienisches Raygras													Brache
1910	Buchweizen													Brache

abgeschlossenen Versuche mitgeteilt. Es ergab sich: Die Gesamt-N-Abgabe der Getreidekästen ist viel geringer als die der Kartoffelkästen. Dies resultiert nicht aus einer geringeren N-Menge der Ernten, denn diese ist auf den Getreidekästen größer gewesen als auf den Kartoffelkästen, sondern aus einer höheren N-Abgabe im Drainwasser dieser letzteren. Der Gesamt-N-Nutzen dreijähriger Gründüngung im Laufe von 7 Jahren war nur gering, wenn diese Gründüngung früh unterbracht ist, während bei einer späteren Unterbringung der Gründüngung der Nutzen ein ganz beträchtlicher gewesen ist. Er betrug hier auf ein Jahr und auf ein Hektar berechnet:

bei	1	7	2	8
	14,0 kg N	13,7 kg N	17,8 kg N	19,9 kg N

und nimmt man an, daß Salpeter-N im Durchschnitt zu 55 Proz. ausgenutzt wird, so entspricht diese Menge

	25,5 kg N	25,0 kg N	32,4 kg N	36,2 kg N im Chili
gleich	1,5 dz Chili	1,6 dz Chili	2,2 dz Chili	2,4 dz Chili.

Der vom Gründüngungs-N zu den Ernten nicht verbrauchte N wird zum größten Teil ausgewaschen.

Die N-Ausgabe im Drainwasser ist ferner in allen Fällen bei der Herbstunterbringung der Gründüngung viel größer gewesen als bei der Frühjahrunterbringung. Besonders hoch war sie auf den Kartoffelkästen 3, 5, 9 und 11. Das resultiert daraus, daß die spät untergebrachte Gründüngung während der Zeit ihres späten Wachstums den löslichen Bodenstickstoff festgehalten und gleichzeitig noch eine größere Menge von Wasser verbraucht hat.

Die N-Ausgabe in den Ernten ist in allen Fällen bei der Frühjahrsunterbringung größer gewesen.

Faßt man bei den Kartoffelversuchen die Kästen mit Frühjahrs- und Herbstunterbringung zusammen, so verhalten sich die N-Mengen in der Ernte und im Drainwasser

1 + 7 wie 49 : 60,2 oder = 100 : 123,
3 + 5 + 9 + 11 wie 64 : 129,8 oder = 100 : 203.

Diese Zahlen zeigen auf das deutlichste ebenso wie alle anderen den großen Nutzen der späten Unterbringung der Gründüngung bei Hackfruchtfolge.

Besonders hervorzuheben ist, daß Kasten 13 (fortwährender Anbau ohne Gründüngung) und Kasten 14 fast genau dieselben N-Mengen in den verflossenen 6 Jahren abgegeben haben. Kasten 13 $^{5}/_{9}$ davon in der Ernte und $^{4}/_{9}$ in dem Drainwasser, Kasten 14 alles im Drainwasser. Nichts zeigt deutlicher, als diese Zahlen, von welch eminenter Bedeutung es ist, leichten Boden möglichst andauernd unter einer Frucht zu halten. Der unmittelbare Nutzen der Gründüngung ist durch die Erhöhung der auf die Gründüngung folgenden Ernten und durch ihre Nachwirkung auf die Nachfrüchte gezeigt.

Die Ergebnisse des letzten Versuchsjahres ließen eine sehr verschiedene Nachwirkung der Gründüngung auf den Kartoffel- und Getreidekästen erkennen, und es machte sich ein Rückgang im N-Ertrag auf den Getreidekästen bemerkbar, welchen Verf. darauf zurückführt, daß hier die Stoppeln zur Wirksamkeit gekommen sind, und daß sich im Zusammenhang hiermit Erscheinungen der Denitrifikation bemerkbar machten. Im ganzen war aber der Effekt der Nachwirkung der Stoppeln ein günstiger. Sie haben einen Teil des N festgehalten und vor Auswaschung geschützt, und es scheint auch, als ob ihre Zersetzungsprodukte auf die N-Sammlung günstig eingewirkt haben, sonst wäre es nicht erklärlich, daß die Getreidekästen 6, 8, 10 und 12 mehr N im Jahre 1910 abgeben konnten als die Kästen 1 und 7.

Die Gesamt-N-Ausgabe ergibt sich aus der Addition der in den Ernten und der in dem Drainwasser enthaltenen N-Mengen:

N in	1	2	3	4	5	6	7
Ernte	1,9988 g	2,7142 g	2,0066 g	2,5968 g	2,2836 g	2,3164 g	2,1072 g
Wasser	0,9557 g	0,9660 g	0,7775 g	0,8159 g	0,8178 g	1,0323 g	0,8127 g
Sa.:	2,9545 g	3,6802 g	2,7841 g	3,4127 g	3,1004 g	3,3487 g	2,9199 g

	8	9	10	11	12	13	14
Ernte	3,3555 g	2,2678 g	3,4017 g	2,2444 g	2,5309 g	2,0878 g	—
Wasser	0,6927 g	0,6277 g	0,7603 g	0,7610 g	0,8193 g	0,8323 g	1,3280 g
Sa.:	4,0482 g	2,8955 g	4,1620 g	3,0054 g	3,3502 g	2,9203 g	1,3280 g

Die Gesamt-N-Ausgabe ist auf den Kästen, die früher Getreide getragen hatten, stets nicht unwesentlich größer gewesen als auf den alten Kartoffelkästen. Dagegen zeigt im Vergleich mit der tiefen die flachere Unterbringung der früheren Gründüngung nur auf den Getreidekästen eine größere N-Ausgabe. Auf den früheren Kartoffelkästen ist ein merklicher Unterschied in der N-Abgabe nicht vorhanden. Das umfangreiche der Publikation beigegebene Tabellen- und Kurvenmaterial gibt außerdem über eine große Reihe von Einzelfragen Aufschluß. Vogel (Bromberg).

Harnoth, Über den Stand der Gründüngungsfrage in Mittel-, West- und Süddeutschland. (Mitt. d. Deutschen Landw. Gesellsch. 1913. St. 29. p. 421.)

Das extrem trockene Jahr 1911 ermöglichte Beobachtungen über den Einfluß der Gründüngung auf den Wasserhaushalt des Bodens. Solche Beobachtungen sind in umfangreichem Maße seitens der D. L. G. angestellt worden, und nachdem bereits von Trunz über das Resultat der Erhebungen in den östlichen Provinzen berichtet worden ist (Mitt. d. D. L. G. 1912. St. 31), stellte Verf. nunmehr das auf Mittel-, West- und Süddeutschland bezügliche Material zusammen. Aus der großen Zahl der vorliegenden Einzelberichte kann geschlossen werden, daß die im Jahre 1911 in Gründünger stehenden Saaten durchweg besser standen als solche ohne Gründüngung und auch solche in Stallmist oder Brache. Am stärksten wurde die günstige Wirkung bei Kartoffeln und Rüben beobachtet, weniger bei Hafer und zurücktretend bei Roggen, der am wenigsten unter der Dürre gelitten hat. Erwähnt sei noch, daß auf leichten Böden ungünstige Wirkungen dort beobachtet wurden, wo im Jahre 1910 die Lupinen stark entwickelt gewesen sind. Man schreibt das der allzugroßen Lockerung des Bodens zu, die sich infolge der schlechten Zersetzung der Grünmasse bemerkbar machte und die Wasserverhältnisse ungünstig beeinflußte. Vogel (Bromberg).

Jancsó, Béla, Chlornatrium als Düngemittel für Zuckerrüben. (Köztelek. XXIII. 1913. p. 808—809.) [Magyarisch.]

1. Da die wilde Stammform der Zuckerrübe auf salzhaltigem Boden an den Küsten des Mittelmeeres gut gedeiht, war es von vornherein zu erwarten, daß eine Düngung mit Industrie-Kochsalz den Ertrag erhöhen wird. Tatsächlich zeigte sich dies, wenn mindestens 174 kg per 1 ha angewandt wurden.

2. Ist der Boden aber schwer, so entstehen Risse im Boden, welche der Entwicklung der Pflanzen schädlich sind. Matouschek (Wien).

Bornemann, In welchem Maße tragen Stallmist und Gründüngung durch Lieferung von Kohlensäure zum Ernteertrag bei? (Mitt. d. Deutsch. Landw. Gesellsch. 1913. p. 443.)

Angeregt durch die günstigen Resultate, welche Hugo Fischer (Gartenflora. 1912. H. 14) bei der Zufuhr von Kohlensäure zu wachsenden Pflanzen der verschiedensten Art erzielt hatte, führte Verf. gemeinschaftlich mit Fischer einen Versuch aus, bei welchem den auf Freilandbeeten angebauten Pflanzen (Spinat) durch flach (5 cm) in den Boden eingeschlossene Röhren dauernd Kohlensäure zugeführt wurde. Durch diesen Versuch sollte festgestellt werden, ob es möglich ist, den Blättern auf dem Wege durch den Boden CO_2 zuzuführen, und ob die so zugeführte CO_2 in nennenswertem Maße von den Blättern verarbeitet wird. Es ergaben sich folgende Erträge an frischer Pflanzenmasse:

Ernte von 6 qm bei CO_2-zufuhr	10,608 kg	
„ „ 6 qm ohne „ „	9,455 kg	
Demnach mehr durch die CO_2-zufuhr . .	1,153 kg	oder 12,2 Proz.

In der Praxis kann ein erhöhte Zufuhr von CO_2 zu den Kulturpflanzen vorläufig nur durch Einverleibung organischer Massen in den Boden geschehen. Es wäre dann durch exakte Versuche zu prüfen, in welchem Maße die bei deren Zersetzung entstehende CO_2 von den angebauten Pflanzen wieder aufgenommen wird. „Es würde sich dann zeigen, wie viel von der Wirkung des Stallmistes auf eine direkte Düngerwirkung der in ihm enthaltenen mineralischen Nährstoffe und N-haltigen Verbindungen, und wie viel auf CO_2-zufuhr zu rechnen ist. Es würde, wenn dieser Anteil erheblich ist, der Stallmist eine ganz andere Bewertung erfahren müssen, als sie ihm heute zuerkannt wird. Es würde sich eine sehr einfache Erklärung für die Fragen ergeben, warum Höchsternten in Kartoffeln und Zuckerrüben nicht ohne Stall- oder Gründünger erzeugt werden können; warum Stalldünger bei Roggen und Gerste weniger zur Geltung kommt als bei Hafer, und warum viele Landwirte an der früher allgemein geübten Praxis, die Leguminosen mit Stalldünger zu düngen, festhalten. In allen diesen Fällen würde durch das längere Zeit dicht geschlossene Blätterdach eine vollkommenere Ausnutzung der aus dem Boden entweichenden CO_2 erreicht werden.“ (Eine Nachprüfung und Erweiterung der vorläufig nur in sehr primitiver Weise ausgeführten Versuche wird um so mehr erforderlich sein, als bekanntlich von anderer Seite (P. Wagner, Mitscherlich) keinerlei Erfolge durch CO_2-zufuhr etzielt werden konnten. Ref.). Vogel (Bromberg).

Bussmann, Erich, Einige Versuche über den Einfluß von Phonolith und Kalktraß auf das Stickstoffsammlungsvermögen von Ackererden. (Journ. f. Landwirtsch. Bd. 61. 1913. p. 126.)

Die Versuche sind im Anschluß an eingehende Untersuchungen über die zeolithischen Eigenschaften des gemahlenen Phonoliths und des Kalktraßdüngers ausgeführt worden. Es wurden zunächst zwei Böden verwendet, ein Sandboden mit äußerst geringem Kalkgehalt und ein humoser kalkreicher Lehm. Nach Zugabe von Dextrose und bestimmter Mengen von Phonolith und Kalktraß (5—50 g auf 500 g Boden) wurden die Erden in der A. Koch-schen Anordnung 30 Tage lang auf Tellern ausgebreitet im Brutschrank gehalten.

Im Sandboden blieb die Phonolithbeigabe ohne Wirkung, im humosen Lehmboden dagegen stieg mit steigender Phonolithgabe auch die Stickstoffassimilation zweifellos an. Die entsprechenden, auf 100 g trockenen Boden berechneten Werte sind

Lehmboden allein	158,3 mg
„ + Dextrose	158,9 „
„ + „ + 5 g Ph.	158,3 „
„ + „ + 20 g Ph.	164,7 „
„ + „ + 35 g Ph.	170,1 „
„ + „ + 50 g Ph.	177,4 mg.

Die Hiltnersche Ansicht, daß Phonolith bei Gegenwart entsprechender organischer Substanz zur Erhöhung der Stickstoffsammlung beiträgt, erhält durch die Versuchsergebnisse eine Stütze. Da der Zuckerzusatz ohne Wirkung auf die N-sammlung blieb, so scheinen die Humusstoffe des Lehmbodens im Verein mit Phonolith das N-sammlungsvermögen erhöht zu haben.

Ganz anders verhielt sich der Kalktraß. Er hat in beiden Bodenarten die N-sammlung verbessert, seine Wirkung war also unabhängig von dem Vorhandensein humusartiger Bestandteile des Bodens. Wahrscheinlich bedingen die kolloiden Bestandteile des Kalktraßes sein Verhalten.

Diese Resultate veranlaßten Versuche mit noch vier weiteren Böden, die außer in der geschilderten Weise auch auf Anwesenheit von Azotobakter und N-bindungsvermögen in Mannitnährlösung nach Zugabe von Phonolith und Kalktraß geprüft wurden. Die Ergebnisse bestätigten, daß die Silikate eine erhöhte N-sammlung vor allem durch Begünstigung der Azotobakterentwicklung hervorzurufen imstande sind, allerdings nur unter ganz bestimmten Verhältnissen und unter dem Einflusse noch zu erforschender Faktoren.

Vogel (Bromberg).

Koch, Alfred, Ergebnisse zehnjähriger vergleichender Feldversuche über die Wirkung von Brache, Stalldünger und Klee. (Journ. f. Landwirtsch. 1913. p. 245—281.)

Verf. hat an zwei Gruppen von Fruchtfolgen die Wirkung von ungedüngter Schwarzbrache, Stalldünger und Klee auf die Nachfrüchte studiert und verglichen. In der vorliegenden Arbeit wird über die Ergebnisse der ersten im Jahre 1903 eingerichteten Gruppe von Versuchen berichtet, deren drei Reihen sich nur durch die Behandlung des ersten Jahres unterscheiden, im zweiten bis vierten Jahre folgten auf die in ihrer Wirkung zu prüfenden Systeme Winterweizen, Roggen und Sommergetreide. Die Ernteergebnisse sind nach Gewicht und Geldwert unter Berücksichtigung der Saatgut- und Düngerkosten angegeben.

Die Erträge nach Brache waren recht befriedigend. Addiert man unter Ausschluß des ersten Jahres die Getreideerträge der drei folgenden Jahre, so bekommt man in allen drei Fruchtfolgen fast dieselben Zahlen, nämlich:

Kleefruchtfolge	480,63 ℳ
Brachefruchtfolge	476,58 ℳ
Stalldüngerfruchtfolge	469,12 ℳ.

Einen Mehrertrag gegenüber den anderen Fruchtfolgen hat die Brache auf dem milden Lehmboden des Versuchsfeldes daher nicht gebracht, sie erwies sich aber als ebenso wirksam wie der stickstoffsammelnde Klee und die starke Stallmistdüngung. Verf. schließt hieraus, daß sich der Boden nach Schwarzbrache in so guter physikalischer Beschaffenheit befindet, daß er mit den vorhandenen Bodennährstoffen hohe Ernten liefern kann. Für eine erhöhte Salpeterbildung im Bracheboden sprechen die in verschiedenen Jahren ermittelten Werte nicht, der Nitratgehalt der Bracheparzellen schwankte meist wenig um 1 mg in 100 g wasserfreiem Boden und stieg nur während längerer Trockenperioden etwas an. Die hohen Getreideernten nach Brache werden daher kaum aus einer verstärkten Salpeterbildung Nutzen gezogen haben, vielmehr wird die günstige physikalische Bodenbeschaffenheit die Pflanzen befähigt haben, den im Boden als Salpeter gebotenen Stickstoff so gut zu verwenden, daß sie damit die beobachteten hohen Erträge erzeugten.

Eine endgültige Entscheidung der Frage, ob bei Brachhaltung ein Raubbau an Bodenstickstoff getrieben wird, oder ob sich in ihrer Folge eine Verarmung des Bodens an Stickstoff nicht einstellt, wird, wie Verf. betont, erst durch viel längere Zeit fortgesetzte Versuche möglich werden. Bisher ist ein Rückgang der Ernten in den Brachefruchtfolgen nicht erkennbar gewesen, sondern, wenigstens bei Weizen und Hafer, sogar ein deutlicher Anstieg. Es konnte experimentell erwiesen werden, daß bei langer Versuchsdauer (2¼ Jahre) auch in einem nicht mit organischem Energiematerial versetzten Boden nachweisbare Stickstoffzunahmen eintreten. Gehen diese Stickstoffbindungsprozesse auch im freien Felde vor sich, „so wird der Stickstoffgehalt des Bodens durch Luftstickstoffbindung immer wieder aufgefüllt und eine Verarmung des Bodens an Stickstoff wird bei Fortsetzung der Schwarzbrachefruchtfolge nicht fühlbar werden“.

Von Interesse ist die im Laufe der Versuche gemachte Feststellung, daß es praktisch gleichgültig ist, ob der Stalldünger sogleich im Herbst oder, nachdem er über Winter gebreitet lag, im Frühjahr untergepflügt wird. Dieses Ergebnis steht in einem gewissen Widerspruche mit der herrschenden Auffassung, nach welcher es unzweckmäßig ist, den Dünger längere Zeit gebreitet auf dem Felde liegen zu lassen wegen der hierbei zu befürchtenden Ammoniakverdunstung. Es scheint aber, daß die ungünstige Wirkung solcher Stickstoffverluste durch die Erfolge der guten Gare verdeckt wird, in der sich der Boden der im Frühjahr gepflügten Parzellen durch die lange Bedeckung und Beschattung durch den Stalldünger befindet.

Wenn die Resultate der vorliegenden Arbeit durch die Erfahrungen der folgenden Jahre in mancher Richtung ergänzt, vielleicht auch korrigiert werden sollten, so lassen sie doch klar erkennen, daß nur auf Grund langfristiger, mit größter Kritik durchgeführter Versuche die heftig umstrittene Frage der Brachewirkung einer befriedigenden Lösung entgegengeführt werden kann. Vogel (Bromberg).

v. Seelhorst, Die Wasserbilanz und die Nährstoffverluste eines gebrachten Lehm- und Sandbodens in den Jahren 1905—1912. (Journ. f. Landwirtsch. 1913. p. 189—215.)

Die Versuche sind in fahr- und wägbaren eisernen Vegetationskästen von 1⅓ cbm Inhalt ausgeführt worden und erstrecken sich auf 8 Jahre (1905 bis 1912). Sowohl der Lehm wie der Sand haben während des Sommers eine wiederholte Brachebearbeitung erfahren.

Die Wasserverdunstung war auf dem Lehmboden im ganzen stärker als auf Sandboden, im einzelnen sind je nach Witterung und Jahreszeit Differenzen beobachtet worden.

Bei Sandboden nahm der prozentuale N-Gehalt des Drainwassers der gleichen Monate in der Zeit von 1905—1910 ziemlich regelmäßig und dabei stark ab. Im Jahre 1912 erfuhr der Prozentgehalt an N eine erhebliche Steigerung, die sich dadurch erklärt, daß die Hauptmenge des in dem sehr trockenen Jahre 1911 gebildeten Salpeterstickstoffs erst in den ersten drei Monaten des Jahres 1912 zur Auswaschung kam. Das Minimum des N-Gehaltes des Drainwassers entfiel auf die Monate Februar—April, das Maximum wurde erreicht in der Zeit von Juli—September. Es dürfte dies mit dem Rückgang der Salpeterbildung in der kälteren Jahreszeit und deren Anstieg in den Sommermonaten zusammenhängen.

Bei dem Lehmboden machte sich ein fortschreitender Abbau der organischen Substanz nicht in gleichem Maße bemerkbar, wahrscheinlich wegen der hier stattfindenden kräftigen N-Sammlung, durch welche ein Ersatz des nitrifizierten und ausgewaschenen N eintritt. Das Maximum des prozentualen N-Gehaltes lag, umgekehrt wie beim Sandboden, in den Wintermonaten, das Minimum in den Sommermonaten. Es erklärt sich dies durch die viel geringere Durchflußgeschwindigkeit des Wassers beim Lehmboden und sein bedeutend größeres Aufnahmevermögen für Wasser.

Die aus dem gebrachten Sand ausgewaschenen N-Mengen erfuhren eine regelmäßige jährliche Abnahme, sie betrugen:

1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912
9,278	4,122	2,540	1,953	2,206	1,788	1,549	6,910 g N

Beim Lehmboden fand eine so regelmäßige Abnahme nicht statt, die betreffenden Zahlen waren:

1905	1906	1907	1908	1909	1910	1911	1912
11,608	8,131	3,834	3,880	6,193	6,758	2,936	10,666 g N

Das Jahr 1912 weist wie beim Sand eine merkliche Steigerung des N-Verlustes auf, die wiederum mit der Trockenheit des Jahres 1911 zusammenhängt.

Auf den Hektar berechnet sind pro Jahr verloren gegangen in Kilogramm:

	1908	1909	1910	1911	1912
Sand	19,5	22,1	17,9	15,5	69,1
Lehm.	38,8	61,9	67,6	29,4	106,7

also sehr bedeutende Mengen, wie sie natürlich nur auf dauernd unbebautem Lande zustande kommen können.

Die Drainwässer dienten weiter zu einer Reihe von Bestimmungen (Rückstand, Kalk, Magnesia, Schwefelsäure), auf welche hier nur verwiesen sei. Vogel (Bromberg).

Tacke, Br. u. Brüne, Fr., Vergleichende Düngungsversuche mit Kalkstickstoff, Stickstoffkalk, Chilesalpeter und schwefelsaurem Ammoniak auf Sand- und Hochmoorböden. (Die landw. Vers.-Stat. Bd. 83. 1913. p. 1—100.)

Aus dem umfangreichen Bericht interessiert zunächst die Erklärung, welche die Verff. für die ungünstige Wirkung des Kalkstickstoffs auf Hochmoorboden geben. „Diese ist aller Wahrscheinlichkeit nach in dem Gehalt an freien Humussäuren zu suchen, den dieser Boden auch nach Anwendung normaler Kalkmengen, wie sie die Überführung in Kulturland erheischt, noch in jedem Fall besitzt. Es ist nun anzunehmen, daß die freien Humussäuren der in nicht sauren Böden anscheinend ziemlich schnell verlaufenden bakteriellen Umwandlung des Calciumcyanamids in Ammoniak und weiter in Salpetersäure hinderlich sind oder diesen Umwandlungsprozeß wenigstens verlangsamen. Eine Verlangsamung der Überführung des Calciumcyanamids und seiner Spaltungsprodukte in Pflanzennahrung muß aber von um so nachteiligerem Einfluß sein, als diese Substanzen auch für erwachsene Pflanzen schon in sehr geringen Mengen starke Gifte darstellen.“ (Ob sich diese im weiteren Verlauf der Arbeit für unbefriedigende Kalkstickstoffwirkungen wiederholt gegebene, nur die bakteriellen Einflüsse berücksichtigende Erklärung nach den neueren Resultaten [besonders Kappens] aufrecht erhalten lassen wird, erscheint jedoch fraglich. Ref.)

Bei den Versuchen sind die zu prüfenden Düngemittel zu den verschiedensten Zeiten gegeben worden, nur zu Roggen stets im Frühjahr als Kopfdünger. Die Düngungsversuche auf Sandboden bestätigten im wesentlichen die andernorts gemachten Erfahrungen. Es erwies sich als unzweckmäßig, den Kalkstickstoff gleichzeitig mit der Einsaat zu verabreichen oder ihn als Kopfdünger zu geben. Wurde der Kalkstickstoff jedoch einige Zeit vor der Aussaat — 8 Tage waren ausreichend — durch tüchtiges Eggen mit der obersten Bodenschicht gemischt, so war von einer Schädigung der Keimkraft in keinem Falle etwas zu merken.

Auffallend war, daß der Kalkstickstoff im großen Durchschnitt der Versuche auf Sandboden dem Chilesalpeter sehr viel näher stand als das schwefelsaure Ammoniak. Jener erreichte bei zweckmäßigster Anwendung (vor der Einsaat) 89 Proz. der Salpeterwirkung. Setzt man die aus dem Salpeter aufgenommenen N-Mengen = 100, so ergibt sich für schwefelsaures Ammoniak die Zahl 78, für Kalkstickstoff und Stickstoffkalk der Durchschnittswert 54.

Auf Hochmoor verhielten sich Kalkstickstoff und Stickstoffkalk in mancherlei Hinsicht ebenso wie auf Sandboden. Insbesondere bewirkte die Anwendung bei der Aussaat Schädigungen der Keimkraft und Ausfälle in den Ernten. Hierbei traten Unterschiede im Verhalten des Kalkstickstoffs und Stickstoffkalks hervor. Der letztere schädigte vermutlich wegen seines Gehaltes an Chlorcalcium in erhöhtem Maße und stand überhaupt auf Hochmoor dem Kalkstickstoff etwas nach. Er erreichte im Durchschnitt der Versuche nur 81 Proz. von dessen Wirkung. Die Kopfdüngung mit Kalk stickstoff bewährte sich bei Kartoffeln und Hafer besser als bei Roggen. Setzt man die N-Ausnutzung beim Chilesalpeter = 100, so betrug sie beim schwefelsaurem Ammoniak ebenfalls 100, beim Stickstoffkalk 76 und beim Kalkstickstoff 57.

Im wesentlichen ergibt sich aus den Versuchen, daß der Kalkstickstoff nie gleichzeitig mit der Saat in den Boden gebracht werden soll. Auch als Kopfdünger erzielte er in keinem Falle seine besten Leistungen. Die besten Wirkungen wurden immer dann beobachtet, wenn der Kalkstickstoff einige Zeit vor der Saat in den Boden gebracht wurde. Vogel (Bromberg).

Burri, R., Über die Beziehungen gewisser Schimmelpilze des Bodens zu den benzoësauren Salzen und anderen aromatischen Körpern der Gülle. (Chemiker-Ztg. 1913. p. 876.)

Da mit der Jauche große Mengen von Benzoaten in den Erdboden gelangen, war es von Interesse, das weitere Verhalten dieser Verbindungen im Boden zu verfolgen.

In Gemischen von beliebigen Erdproben mit dem zehnfachen Volumen Wasser, dem steigende Mengen von Kaliumbenzoat zugefügt waren, kam regelmäßig eine Schimmelvegetation zum Vorschein, die in benzoatfreien Kontrollen ausblieb, und bei einem Gehalt von 1—2 Proz. Benzoat am kräftigsten war. Reinkulturen dieses Pilzes, der bis jetzt nicht identifiziert werden konnte, bringen auf geeigneten Nährböden in charakteristischer Weise gefärbte, braunviolette Sporenmassen hervor. Auch in Erde, die mit Benzoatlösungen nur mäßig durchfeuchtet war, kamen Schimmelpilze zur Entwicklung, die in Reinkultur aber keine Sporen bilden. In wäßrigen Erdaufschwemmungen, die mit Phenol und p-Kresol versetzt waren, gediehen ebenfalls Schimmelpilze, deren Reinzüchtung bisher nicht gelungen ist.

Vogel (Bromberg.)

Liechti, Paul, Über die Wirkung des Schwefels auf das Pflanzenwachstum. (Chemiker-Ztg. 1913. p. 877.)

Bei orientierenden Vegetationsversuchen mit Hafer betrug die pro Gefäß verwendete Schwefelmenge 0,3 g, entsprechend 0,005 Proz. des eingefüllten Bodens. In drei Reihen, bei welchen außer mit Stickstoff auch mit Kali und Phosphorsäure in verschiedener Anordnung gedüngt war, trat eine ertragssteigernde Wirkung des Schwefels hervor. Bei Ungedüngt und stickstoffreier Düngung (nur Kaliphosphat) war eine solche nicht als sicher erwiesen zu betrachten. Die stärkste Ertragserhöhung durch Schwefel war bei der kalifreien Düngung eingetreten. Ohne Schwefel wurden in diesem Falle geerntet 78,3 g und mit Schwefel 105,8 g Körner und Stroh. Die Versuche sollen in erweitertem Umfange fortgesetzt werden. Vogel (Bromberg).

Pringsheim, Hans, Die Beziehung der Zellulosezersetzung zum Stickstoffhaushalt in der Natur. II. (Mitt. d. Deutschen Landw. Ges. 1913. p. 295.)[1])

Verf. hat aus Erde ein Clostridium isoliert, das bei vollem Luftzutritt auf der Oberfläche einer Kulturplatte gedeiht. Dieses aërobe Clostridium unterscheidet sich weder in morphologischer noch physiologischer Beziehung von dem Clostridium Pasteurianum oder Americanum, gedeiht am besten bei 37°, besitzt die charakteristische Sporenkapsel, kann aber nach den bisherigen Erfahrungen weniger, etwa die Hälfte der von den vorgenannten Arten auf die Einheit des Energiematerials assimilierten Menge Stickstoff binden. Aus der Existenz solcher Organismen folgt, daß die Natur auch dann noch aërobe Stickstoffbindner zur Verfügung hat, wenn aus irgendeinem Grunde der Entwicklung des Azotobacter ein Hemmnis entsteht.

---

[1]) Siehe diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 37. p. 111.

Eine Mischkultur von Methangärungsorganismen und Clostridium Americanum bewirkte Zellulosevergärung unter Stickstoffassimilation auch bei Gegenwart geringer Mengen von Nitraten. Die Stickstoffbindung war aber nicht höher als beim gänzlichen Fehlen von Nitraten. Hieraus geht hervor, daß mit Zellulose als Energiematerial nur dann N-Bindung stattfand, wenn Nitratstickstoff in einem Minimum vorhanden ist, welches unterhalb der Grenze des durch die Vergärung einer gewissen Zellulosemenge in einem bestimmten Flüssigkeitsvolumen erreichbaren N-Gewinns liegt.

Zellulose wurde in Anwesenheit verschiedener N-Quellen bei 55—60° vergoren, in keinem Falle zeigte sich irgendein N-Verlust. Dagegen sind N-assimilierende thermophile Bakterien im Boden stets leicht nachzuweisen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß niedere Temperaturen größere Gefahren für den gebundenen N mit sich bringen, und daß die Chance der Anhäufung des N mit wachsender Temperatur zunimmt. Die Angaben von Kellermann und McBeth über die ihnen gelungene Isolierung von zellulosevergärenden Bakterien konnten nicht bestätigt werden. Verf. gelangte auf dem von diesen Autoren vorgeschriebenen Wege zu Bakterienkulturen, die in keiner Weise imstande waren, Zellulose zu zersetzen. Das Problem der Reinkultivierung von Zellulosebakterien ist offenbar auf diesem Wege nicht zu lösen, und es wird nötig sein, erst ein Verfahren zu finden, um in Flüssigkeitskulturen jede Verunreinigung zu beseitigen. Vogel (Bromberg).

Krainsky, A., Zur Frage der Zellulosezersetzung durch Mikroorganismen. (Russ. Journ. f. exp. Landwirtsch. 1913. p. 261.)

Verf. hat von Papierstreifen, die mit Bodeninfus infiziert waren und teilweise in mineralische Nährlösung eintauchten zwei Aktinomyceten isoliert, die in Reinkultur sehr gut die Zellulose angreifen. Die eine Art (Act. melanocyclus) bildet auf Papier rosige Kolonien, die sich bald mit schwarzen Luftsporen bedecken. Die zweite Form (Act. albo-roseus) entwickelt sich auf Filtrierpapier zu weißen, kreideartigen Auflagerungen. Auf verschiedenen Agarsorten bildet dieser Pilz weiße Luftsporen. Die russische Originalarbeit enthält mehrere photographische Abbildungen der beiden Kulturen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Vogel (Bromberg).

Scales, F. M., McBeth, I. G. and Smith, N. R., Characteristics of cellulose-destroying Bacteria. (Science. Vol. 38. 1913. p. 415.)[1]

The authors studied 17 species of cellulose-destroying bacteria. None of the species studied have shown tendency to form gaseous products and in relation to oxygen all are facultative aerobes. Cellulose agar colonies show two distinct groups: those forming opaque colonies with a defined clear zone beyond the colony and those which form transparent colonies with little or no indication of an enzymic zone. All grow on beef gelatin but only 10 liquefy. In Dunhams solution 9 form ammonia. In litmus milk 10 form acid, 5 form alkali, and two no not grow. Casein was digested in 4 cultures. On potato 6 have shown no growth. Activity towards carbohydrates in pepton solutions permits the following grouping: 1. Those which form acid, 2. Those which form alkalies, 3. Those which give an acid reaction from only part of the peptone carbohydrate solution, 4. Those which produce no change. Heinemann (Chicago).

---

[1] Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 40. p. 167.

Böeseken, J. u. Waterman, H. J., Eene biochemische bereidingswijze van l-Wijnsteenzuur. (Versl. kon. Akad. v. Wet. Amsterdam. 1912. p. 208—211.)

1. Penicillium glaucum-Stämme verarbeiten Rechts- und Linksweinsäure mit gleicher Schnelligkeit.

2. Bei Abwesenheit von Aspergillus niger liefert eine 4-proz. Traubensäurelösung (+ den nötigen anorganischen Salzen) 1,2-proz. Linksweinsteinsäure, weil die andere Säure rascher verarbeitet wird.

Matouschek (Wien).

Cayla, V., Les taches du Caoutchouc de plantation. (Journ. d'Agric. Tropic. Vol. 13. 1913. p. 221—223.)

Zusammenfassende Übersicht der Angaben von Keith Bancroft, The Spotting of Plantation Para Rubber. (Bull. No. 16. Dep. of Agric. F. M. S. Kuala Lumpur. 1913. 30 pp. 3 pl.)

Aus den Flecken wurden folgende Mikroorganismen isoliert:

Monascus heterosporus, Spondylocladium maculans Bancroft, Mycogyne, Diplodia, Aspergillus, Penicillium, Bacillus prodigiosus, Syncephalis, Protococcus nivalis usw.

Die Infektion erfolgt durch Wasser, Luft, Instrumente und Behälter.

Um das Fleckigwerden des Kautschuks zu verhindern, sondere man fleckigen Latex von dem reinen ab und behandele ihn vor der Koagulation mit Formol. Man desinfiziere die Stapelplätze mit Formol oder Schwefel und trockene möglichst schnell. Herter (Berlin-Steglitz).

Tymstra, B. S., Tabaksfermentatie. (Meded. Deli Proefstat. VII. 1912/13. p. 50—60.)

Ein Präparat mit recht starker Peroxydasereaktion, vom Verf. hergestellt, zeigte folgende Eigenschaft: Säure hemmt die Wirkung dieses Präparates, ja bei bestimmter Konzentration wird sie sogar ganz aufgehoben. Es ist in der Tabakpflanze ein Zymogen vorhanden, das bei normaler Temperatur, namentlich bei Gegenwart von Spuren von H-Ionen, in Peroxydase übergeht.

Matouschek (Wien).

McDermott, F. A., On some chemical activities of Citromyces: Utilization of nitrogenous substances, and effects of heavy metals in the medium. (Mykolog. Centralbl. III. 1913. p. 159—160.)

Es wurde das Verhalten von Citromyces glaber und Pfefferianus geprüft, wie weit sie Harnsäure, Hippursäure und ähnlichen Verbindungen als Stickstoffquelle benutzen können. Harnsäure wurde lebhaft zersetzt, weniger dagegen Hippursäure. Das Verhalten gegenüber Metallsalzen wird kurz angegeben. Lindau (Berlin-Dahlem).

Staub, W., Weitere Untersuchungen über die im fermentierenden Tee sich vorfindenden Mikroorganismen. (Bull. Jard. Bot. de Buitenzorg. Ser. 2. T. 5. 1912/13. p. 1—56.)

Auf die Dauer der Fermentation üben weder die Bakterien noch Hefen normalerweise einen Einfluß aus. Das Gleiche gilt bezüglich der Fälle, in denen man Hefereinkulturen dem Tee in den verschiedenen Stadien der Zubereitung zusetzt, mögen die Hefen aus dieser oder jener Fabrik stammen. Ziemlich große Mengen von Hefen oder Bakterien schädigen den Tee nur dann, wenn die Fermentation sehr lange anhält. In solchem Tee, wie auch im normal fermentierten treten zwei Bakterienarten besonders hervor, sie haben ein starkes Schleimbildungsvermögen. Die Teehefe speziell hat die Eigentümlichkeit, die Gerbsäure der Galläpfel in Gallussäure umzusetzen.

Matouschek (Wien).

Herzfeld, Welche Erfahrungen liegen für die Einmietung der Schnitzel unter Impfung mit Lacto-Pülpe vor? (Bl. f. Zuckerrübenb. 1913. p. 273.)

Die günstigen Erfahrungen, welche in Frankreich und bei umfangreichen Versuchen von Zaitschek in Ungarn bei der Impfung ausgelaugter Schnitzel mit Milchsäurebakterien gemacht wurden, sollten, wie Verf. gelegentlich eines Vortrages ausführt, auch in Deutschland zu Versuchen in großem Maßstabe unter praktischen Verhältnissen anregen. Bestätigen sich hierbei die anderwärts erhaltenen günstigen Resultate, „so dürfen wir hoffen, in Zukunft große Summen, die vielleicht nach Millionen zählen dürften, an Nährwert beim Einmieten der Schnitzel zu ersparen und der Landwirtschaft zu erhalten.“

Bei Laboratoriumsversuchen des Verf. wurde sterilisiertes Schnitzelmaterial mit verschiedenen Reinkulturen von Milchsäurebakterien aus Sauerkohl, ferner mit Yoghurtmilch und mit den von Dr. Moser-Wien hergestellten, zur Schnitzelimpfung dienenden Kulturen geimpft und teils bei 30—40°, teils bei Kellertemperatur aufbewahrt. Es zeigte sich, daß nur die Gläser, die warm aufbewahrt waren, alsbald in eine sehr gute Milchsäuregärung übergingen; bei den kalt aufbewahrten stellten sich Schimmelpilze ein. In einigen Gläsern verdarb die Masse in mehreren Monaten vollständig. Gleichzeitig ergaben diese Versuche, daß auch bei der reinen Milchsäuregärung ein erheblicher Teil der festen Schnitzelmasse mit der Zeit verflüssigt wird, und es wird nun in der Praxis festzustellen sein, wie groß diese Verluste sind bzw. ob die sich bildende Flüssigkeit Nährwert besitzt und mit Vorteil mit verfüttert werden kann. Das Impfverfahren selbst wird sich, wie Verf. darlegt, in verschiedener Richtung vereinfachen, verbilligen und den Verhältnissen der Praxis anpassen lassen. Vogel (Bromberg).

Schliephacke, Einsäuern und Futterwert von Rohkartoffeln und Stoppelklee. (Deutsche landw. Presse. 1913. No. 95.)

Verf. bringt die geschnitzelten Rohkartoffeln mit Rübenblättern durchschichtet in die Einsäuerungsgruben und erhält ein besonders für Milchvieh sehr geeignetes Futter. Ist im Herbst kräftiger Stoppelklee vorhanden, welcher nicht mehr getrocknet werden kann, so wird dieser an Stelle der Rübenblätter mit den Kartoffeln eingesäuert. Auch in diesem Falle wird ein vorzügliches Sauerfutter erhalten, das in besonderem Maße dem Mastvieh zusagt.

Vogel (Bromberg.)

Wolodarski, G., Untersuchungen über die feinsten Luftstäubchen. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 75. 1913. H. 3.)

Nach kurzen Angaben über die 1890 bekannt gegebene Methode des Engländers Aitken und den Einzelheiten seines gleichzeitig konstruierten Apparates zur quantitativen Bestimmung der kleinsten unsichtbaren oder als Sonnenstäubchen eben in der Luft noch sichtbaren Partikelchen, werden deutsche Arbeiten von Emmerich, Gemünd, Trillich und anderen angeführt. Die damals in den verschiedensten Orten und Höhenlagen ermittelten Zahlen differieren natürlich sehr stark. Bezüglich des Apparates sei angegeben, daß bestimmte Mengen Luft in eine Kammer gesogen werden, die mit filtrierter Luft gefüllt ist; an der Wand befindet sich feuchtes Filtrierpapier, wodurch die Luft mit Wasserdampf gesättigt ist. Durch Ziehen an einem Pumpengriff wird das Luftvolumen ausgedehnt, hierdurch abgekühlt und mit Wasserdampf übersättigt, welcher sich auch auf den Kondensationskernen (K.-K.) niederschlägt, solche fallen dann als Tröpfchen nieder und werden mittels Lupe gezählt. Diesen von den oben genannten Forschern benutzten Apparat verwendete auch der Verf. und nahm sehr vielseitig, sowohl bezüglich der Höhenlage als Windrichtung (p. 387—391), gestaltete Untersuchungen vor; bei den in Königsberg i. Pr. angestellten Versuchen fand er, ebenso wie andere Forscher in anderen Städten, immer im Zentrum der Stadt die meisten Keime. Die Versuche, bei welchen Verf. dem Aitkenschen Apparate die Ascher sche Pumpe anschloß, haben ihn nicht völlig befriedigt, besonders bei dem Rubnerschen Verfahren für Rußbestimmung (Filtration durch Papier). Nach Verf. kann für die Praxis bei Rußbestimmung der Stadtluft im Freien das Rubnersche Filter sicher in vielen Fällen durch den Aitkenschen Apparat ersetzt werden. Weitere Versuche unternahm Verf. zwecks Feststellung des Zahlenverhältnisses der Kondensation auslösenden Teilchen in der Ein- und Ausatmungsluft. Sehr lehrreiche Versuche finden sich p. 390—393 über Ursache und Entstehung der K.-K., und schon Aitken stellte fest, daß eine starke Beeinflussung der Kondensation in seinem Apparate durch Tabakrauch auftrat. Kondensationsbeeinträchtigend wirken im genannten Apparat die kleinen, in der Luft schwebenden Salzpartikelchen, und die durch gleichzeitiges Verdunsten von Salzsäure und Ammoniak entstehenden Salmiaknebel rufen im Apparate starke Kondensation hervor. Sehr auffallend war bei weiteren im Zimmer ausgeführten Versuchen, daß die Resultate der Zählungen durch im Zimmer brennende Gasflammen sehr beeinflußt wurden; diese Erscheinungen gaben nach theoretischer Besprechung Veranlassung zu praktisch nutzbaren Schlüssen. So wurde ermittelt, daß im Freien die Kondensation im wesentlichen durch die in der Luft suspendierten Rußteilchen bedingt wird und die feinen Rußanreicherungen für die atmosphärischen Veränderungen maßgebend sind, so daß daraus die Frage erwächst, ob nicht durch den vorgeschlagenen Ersatz der Kohlenheizung durch Gasheizung die Rußplage und mit ihr auch die Nebelplage der Städte zu beseitigen sei, sicher ist wohl, daß durch die Gasheizung die Ruß- und Rauchplage vollkommen zu lösen ist. Bezüglich der Nebelplage ist man aber noch zu keiner klaren Schlußfolgerung gekommen.

Als Schlußresultate stellt Verf. folgende Sätze auf:

1. Die Zahl der K.-K. in der Königsberger Stadtluft ist geringer als die in London und etwa ebenso groß wie die in den deutschen Städten, zwischen welchen keine großen Unterschiede existieren, am höchsten ist sie im Zentrum der Städte.

2. Die Zahl der K.-K. der Luft im Freien geht parallel der Schwärzung der Rubnerschen Filter.

3. Der größte Teil der eingeatmeten Rußpartikelchen wird wieder ausgeatmet.

4. Schimmelpilze und Staub haben keinen Einfluß auf die Zahl der K.-K., die mit Aitkenschem Apparat gezählt wurden. Von den Ionen kommen nur die aus Flammen stammenden in Betracht, diese manchmal allerdings sehr stark.

5. Die Verdünnung ist bei Aitken zwar willkürlich gewählt, für praktische Zwecke aber ist es die günstigste.

6. Auch bei Ersatz der Kohlenfeuerung durch Gasfeuerung kann die Nebelplage fortbestehen. Rullmann (München).

Kellerman, Karl F. and Fawcett, Edna H., Studies of the B. subtilis Group. (Science. Vol. 38. 1913. p. 372.)

Numerous cultures of members of the Subtilis group have been obtained from various sources. Biometrical study of their acid production, ammonia production and the reduction of nitrates, together with careful comparison of their morphology, has shown the necessiy for allowing greater range in the description of B. subtilis, B. cereus, B. mycoides, and B. megaterium. The results of the work has brought the authors to the conclusion that B. subtilis comprises 16 species, B. cereus 19 species, B. mycoides 8 species and B. megaterium 5 species.

Heinemann (Chicago).

Ernst, A. und **Bernard, Ch.,** Beiträge zur Kenntnis der Saprophyten Javas. Nr. 10—12. (Annal. Jardin bot. Buitenzorg. Ser. II. T. 9. 1912. p. 219—257. 5 pl.)

J. J. Smith gibt eine eingehende Beschreibung der Burmannia coelestis Don. (p. 219—222). Ein weiteres Kapitel beschäftigt sich mit der Morphologie von der grünen Burmannia coelestis Don. im Vergleiche zu den anderen saprophytischen Arten. Diese Art hat eine kurze Hauptwurzel mit fädigen Seitenwurzeln und Adventivwurzeln, die zwischen den Blättern der grundständigen Rosette entspringen. Letztere beiden Wurzelarten sind verpilzt, Wurzelhaare fehlen stets. Der Stengel ist schärfer differenziert als der der saprophytischen Arten. Bei B. Championii findet man ein knollenförmiges Rhizom, von dem viele dünne Wurzeln ausgehen; B. candida aber hat kurze fleischige Wurzeln. Beide Arten sind saprophytisch. Die Blätter von B. coelestis sind ganz anders gebaut als die letzteren Arten. Ein weiterer Abschnitt beschäftigt sich mit der Entwicklungsgeschichte des Embryosackes, des Embryos und des Endosperms bei B. coelestis, wobei auf zytologische Eigenheiten und auf Teilungen überhaupt genau eingegangen wird. Der ersten Teilung des sekundären Embryosackkernes folgt die Ausbildung einer Basal- oder Haustorialzelle nach. Matouschek (Wien).

Ernst, A. u. **Schmid, E.,** Über Blüte und Frucht von Rafflesia. (Ann. Jard. bot. Buitenzorg. XXVIII. p. 1—59. 1913. 8 T.)

In 8 Kapiteln wird über die Ergebnisse morphologisch-biologischer Beobachtungen und über zytologische Fragen berichtet und zwar über Rafflesia Patma Bl., R. Rochussenii T. et B., R. Hasseltii Sur., Brugmansia Zippelii Bl. Die Untersuchungen befassen sich mit der Blüte, dem Androeceum (die Pollensäcke öffnen sich nicht mit gemeinsamen Porus, sondern münden einzeln in zentrale Grübchen des Antherenscheitels), Entwicklung des Pollens, Gynoeceum und erste Entwicklung der Samenanlagen, Teilung der Embryosackmutterzelle und Entwicklung des Embryosackes, Bestäubung und Befruchtung (Rafflesia weist Fremdbestäubung auf, bei Brugmansia ist auch Selbstbestäubung in den zwittrigen Blüten möglich), Embryo- und Endospermentwickung, Frucht und Same. Es werden eine Menge von interessanten neuen Details angegeben, über die in der Originalarbeit nachzusehen ist.

Matouschek (Wien).

Hayata, B., Über die systematische Stellung von Mitrastemon, als einer neuen Gattung und besonderen Tribus der Rafflesiaceen. (Botan. Jahrb. f. System. Bd. 51. 1913. p. 164—176, 1 Taf.)

Mitrastemon Yamamotoi Mak. ist ein zweigloser, blattloser, einblütiger Parasit auf den Wurzeln von Quercus cuspidata; er findet sich auf 1 cm dicken Wurzeln oft in großer Zahl. Das intramatrikale Gewebe ist eine formlose Masse, welche in die Rinde der Wirtswurzel eindringt, indem es mit vielen rechts und links längs der Wurzel verlaufenden netzartig ineinander gewundenen Fäden die Wirtswurzel völlig umgibt und in der mittleren Schicht der Rinde und auf der äußeren Seite der Kambiumschicht sich verzweigt. Viel feinere Fäden dringen senkrecht gegen die Mitte des Holzes vor („wagerechte“ bzw. „senkrechte“ Fäden). Das Verhalten des Thallus und der Fäden wird eingehend besprochen. Die sekundäre Rinde der befallenen Wirtswurzel schwillt stark an, auch besitzt sie nur eine schwache Andeutung plattgedrückter Lamellen, welche durch die sogenannte Obliteration (Tschirsch) der Siebröhren verursacht ist. Die nicht befallene Wurzel zeigt das Gegenteil. Die Pflanze ist von den übrigen Rafflesiaceen dadurch verschieden, daß sie ausnahmslos einen oberständigen Fruchtknoten und hutförmig verwachsene Staubblätter aufweist. Daher schafft Verf. für sie die neue Tribus der Mitrastemoneae, die unmittelbar nach den Apodantheae im System Solms-Laubachs folgt.

Matouschek (Wien).

Untersuchungsmethoden, Instrumente etc.

Molisch, H., Mikrochemie der Pflanze. IX + 394 p. m. 116 Figg. i. Text. Jena (G. Fischer) 1913. ℳ 13,—.

Wie der Verf. im Vorwort an der Hand eines kurzen historischen Überblickes schlagend nachweisen kann, ist durch eine Reihe grundlegender mikrochemischer Werke (Zimmermann, H. Behrens, Emich und andere) der Boden für eine zusammenfassende Behandlung der Mikrochemie der pflanzlichen Zelle und der pflanzlichen Gewebe gut vorbereitet. Was uns aber der Verf. in dem vorliegenden Werke gibt, ist viel mehr, als nach dieser Darlegung zu erwarten war. Zu einem ungewöhnlich großen Teil sind die Tatsachen und Methoden dieses Handbuches die ureigenste Frucht der Arbeit des Verf. und seiner Schüler, mindestens aber von ihm in solcher Weise nachgeprüft, daß nunmehr klar zutage liegt, wo Lücken noch der Ausfüllung harren, Lücken, die vor allem in Hinsicht auf die besonderen technischen Anforderungen des histochemischen Nachweises (im Gegensatz zur Reaktion im Tropfen!) resultieren.

Wer, wie der Ref., zurzeit Veranlassung hat, eine mikrochemische Differenzierung im histologischen Bilde sekundär kränkelnder Pflanzen (speziell bei der Bearbeitung der Frage der Wiederbegrünung nach Kahlfraß) zu erstreben, wird ohne weiteres die weittragende Bedeutung dieses Werkes zu würdigen wissen, die es den Pflanzenpathologen bei seinen Studien zur Erforschung des Wesens einer Krankheit zu einem unentbehrlichen Berater, auch in rein technischer Beziehung, macht.

Wolff (Eberswalde).

Stuchlik, Jar., Serologie in der Botanik. (Biologieké Listy. 1913. p. 577.) [Böhmisch.]

Ein Übersichtsartikel, in welchem die in zahlreichen medizinischen Zeitschriften zerstreuten Arbeiten zusammenfassend behandelt werden. Verf. macht auch aufmerksam auf andere Probleme (Pfropfbastarde, Systematik der Pflanzen), die auf Grund der serologischen Methoden (Eiweißspezifität) gelöst werden könnten. Vollständiges Literaturverzeichnis.

Jar. Stuchlík (Zürich).

Legendre, R., Simple tour de main pour obtenir une chambre humide microscopique. (Compt. rend. Soc. Biol. T. 76. 1914. p. 265, 1 Fig.)

Pour éviter d'écraser les préparations à examiner à de forts grossissements L. conseille la technique suivante. La lamelle étant bien propre, on la prend avec une pince et l'on présente successivement ses quatre coins à la flamme-veilleuse d'un bec Bunsen. Il se forme par la fusion du verre une petite perle, dont on règle la grandeur par la durée du chauffage. On obtient des perles de la même grosseur en chauffant les extrémités de la lamelle pendant des temps égaux. Ce dispositif empêche l'écrasement des objets entre la lame et la lamelle; il a l'avantage de la fixité. On peut régler à volonté l'espace entre la lame et la lamelle. H. Kufferath (Bruxelles).

Fred, Edwin Brown, The Use of Stains in the Study of Bacteria. (Ann. Rep. Virginia Polytechn. Inst. Agr. Exp. Stat. 1911—1912. p. 202—205.)

This is a general discussion of the use of stains in differentiating bacteria and in estimating the number of bacteria in such substances as milk and sewage.

No new results are given. Rogers (Washington).

Beijerinck, M. W., Over het indringen van methyleenblauw in levende cellen na indroging. (Versl. kon. Akad. Wet. Amsterdam. 1913. p. 930—933.)

1. Lebende Hefezellen setzen dem Eindringen des genannten Farbstoffes einen Widerstand entgegen. Verf. zeigt, daß dasselbe sehr leicht eintritt, wenn die Hefe trocken ist. Solche Hefezellen keimen normal, ihre Tochterzellen sind aber farblos.

2. Zum Vergleiche wurden getrocknete Samen von **Brassica rapa** mit 0,1-proz. Lösung von Methylenblau gefärbt. Der Farbstoff dringt durch die Mikropyle am raschesten ein, daher wird das Gewebe der Keimwurzel am ehesten gefärbt. Die so behandelten Samen verloren ihre Keimkraft nicht. Erst beim weiteren Wachstum verliert sich die Farbe aus der Keimwurzel und dem anderen Gewebe, da er verdünnt wird.

Matouschek (Wien).

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Smirnow, M. R., The Value of glycerinated Potato as a Culture Medium. (Science. Vol. 38. 1913. p. 369.)

The glycerinated potato medium belongs to the class of the socalled media, which as the term implies, are media of various compositions and are used only for special purposes. They may be employed as follows: 1. for the purpose of isolating microorganisms; 2. to furnish a sufficiently favorable medium for the growth of certain organisms; 3. for specific or differentiating tests; 4. to bring out special features of growth. The cultural characteristics of 25 microorganisms were studied on glycerine potato, plain potato and broth potato, the two latter media being used as controls. The results obtained will be divided into three groups. The first comprising bacteria that show a striking contrast in their cultures on the different potato media; the second showing a slight difference, and the third those showing no difference. The first group includes the following organisms: Three strains of B. mallei, two strains of Actinomyces, B. pyocyaneus, B. subtilis and an unidentified spore-forming bacillus. The B. mallei strains gave lighter colored, moister and more typical honey-like growths on glycerin potato. Actinomyces gave a dry culture made up of isolated colonies. B. pyocyaneus gave a brighter and deeper green pigment on the glycerin medium. The second group included: B. coli, B. mucosus, Sp. cholerae, two unidentified bacteria. There were no striking differences between glycerin potato and ordinary potato. In the third group are included: B. diphtheriae, B. typhosus, B. dysenteriae grass bacilli, sarcinae and a yeast. The chromogenic organisms seemed to give brighter pigments.

Heinemann (Chicago).

Ficker, M., Zur bakteriologischen Wasseruntersuchung. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 75. 1913. p. 147 ff.)

In einer ausführlichen Abhandlung beleuchtet Verf. obiges Thema. Die erste Mitteilung bringt den Nachweis von Bakterien durch das Berkefeld-Filter. Eingehend werden in der Einleitung die verschiedenen Arten von Filterkerzen und deren Methoden, sowie auch deren Reinigung besprochen, woran sich noch Erfahrungen über rückläufige Spülung und anderes anschließen. Auch hier sei die Ungleichheit der Kerzen hervorgehoben und das Erfordernis ihrer ständigen Prüfung und Kontrolle. Dann kommen besondere Angaben über die Hesseschen Versuche, die filtrationsfördernden Zusätze von Kieselgurpulver zu dem zu filtrierenden Wasser und ferner als Novum der Vorschlag, Kieselgur schon vor der Bakterienfiltration auf den Kerzen niederzuschlagen, indem man das Gurpulver in sterilem Wasser aufschwemmt, in das Filter umgebenden Glaszylinder füllt und nun absaugt, wodurch eine Erhöhung der wiedergefundenen Keime bis zu 95—96 Proz. erzielt wurde. — Hesses außerordentlich günstige Resultate unterzieht dann Verf. der Nachprüfung und gibt dann zunächst eine Übersicht über Versuche, die lediglich der Frage der quantitativen Leistungsfähigkeit der Methode gelten. Es folgen erstens Versuche mit Kieselgurmischung und zweitens Versuche mit Vorfiltration von Kieselgur. Da es Verf. nicht gelang, die von Hesse ermittelten Keimzahlen zu erreichen, so traf er bei einer Methode noch einige Abänderungen; er wendet seine Aufmerksamkeit auf das Kieselgurpulver selbst und ferner auf den Einfluß des Trocknens und des Volumens der Rückstoßflüssigkeit, die Verarbeitung des Restes, die Aussaatbestimmung und die Art der Suspensionsflüssigkeit. Auch die Frage,

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ob der Zusatz von Kieselgur auf die zu filtrierende Flüssigkeit ein indifferenter ist, wird erörtert und da ergibt sich, daß der verwendete Colistamm im Leitungswasser ohne Gurzusatz rascher abstirbt als im Wasser mit Zusatz. Bei längerer Versuchsdauer kann jedoch eine Einwirkung des Gurzusatzes bei der wechselnden Zusammensetzung des Gurpulvers, als eines chemisch nicht reinen Körpers, angenommen werden. Es ist daher eine Reinigung durch verdünnte Salzsäure, Zusatz von chlorsaurem Kali und ausreichendem Auswaschen vorzunehmen, auch ist es nicht gleichgültig, bei welcher Temperaturgraden und wie lange das Gurpulver sterilisiert wird. Verf. sterilisierte ebenso wie Hesse bei 150° C eine Stunde lang; in einem Falle keimten aber ungeschädigte Sporen aus und machten durch Hautbildung eine Untersuchung der Platten unmöglich. Auch muß noch geprüft werden, inwieweit pathogene Keime im Wasser durch differente Bestandteile des Gurpulvers beeinflußt werden. Alle diese wichtigen Einzelheiten zieht Verf. in den Bereich seiner Untersuchungen. Er glaubt, daß die Art der Suspensionsflüssigkeit eine sehr wichtige Rolle spielt und hält es nicht für ausgeschlossen, daß bei den von Hesse wiedergefundenen Keimen in manchen Fällen der hohe Prozentsatz durch eine Vermehrung der Keime während der Versuchsdauer begründet sei. Hesse gibt selbst zu, daß die hohen Zahlen auch auf ungleichmäßige Verteilung der Bakterien zurückzuführen seien. Hier sei auf die Versuche von p. 162—163 verwiesen, in welchen erstens das Verhalten von B. coli in Kochsalzlösung + 0,5 Proz. Bouillon und zweitens das Verhalten von B. coli und drittens das Verhalten von Typhus in sterilisiertem Leitungswasser geprüft wird. Hier zeigt sich, daß bei Anwendung von Kochsalzlösung + Bouillon der Colibacillus sich vermehrte, dagegen bei 2. und 3. das sterilisierte Leitungswasser als Aufschwemmungsmaterial während der Versuchsdauer die Keimzahl ziemlich konstant ließ. — Sodann geht Verf. auf die Anlage von Plattenkulturen zur Ermittlung des Keimgehaltes über, bringt Vergleiche zwischen Oberflächenaussaaten und Mischplatten und teilt mit, daß die Unterschiede nicht sehr groß und daß Plattenserien zur Erhaltung von Mittelzahlen anzulegen seien. Dann folgen Versuche mit Filtration unter höherem Druck und Einzelangaben hierüber, aus denen die sich bei derartigen Arbeiten ergebenden Schwierigkeiten zu ersehen und die schwankenden Resultate zu begreifen sind.

Da Verf. schon längere Zeit im Ausland weilt, so kann der Abschluß der Arbeit wohl erst Ende 1914 erwartet werden. Rullmann (München).

Marcas, L., Moyens rapides de contrôle de la pureté de la fermentation lactique. (Laiterie et Elevage. Année 8. 1913. p. 57.)

Dans ce rapport présenté au Congrès de laiterie et du Froid à Gand 1913 M. reconnait la supériorité de la méthode de Mazé pour le contrôle de la pureté de la fermentation lactique. Un bon ferment doit produire 12 grammes d'acide lactique par litre de lait écrêmé, évalués en présence de phénolphtaléine comme indicateur. Il est nécessaire de pasteuriser la crème avant de l'ensemencer avec des ferments lactiques (levain) actifs. M. donne la préparation du levain lactique et son utilisation. Le beurrier suivra la fermentation par dosage de l'acide lactique, l'emploi de catalisimètres n'est pas conseillé. La quantité de levain à introduire dans la crème pasteurisée doit être déterminée de façon que son acidité atteigne son taux maximum après un temps variable selon le travail et la température de fermentation (16 à 18 heures généralement). La méthode de Mazé consiste à ensemencer la crême en fermentation sur milieux solides et à examiner après 24 h. de séjour à 25° C les résultats des ensemencements. Cette méthode permet de surveiller facilement la pureté des levains par l'examen des colonies et de modifier en conséquence le travail pratique. H. Kufferath (Bruxelles.)

Freund, W., Das Biorisatorverfahren nach Dr. Lobeck. (Mitteil. d. D. M. V. Jg. 30. 1913. p. 165; Molkerei-Ztg. Hildesheim. Jg. 27. 1913. p. 1489; Bayrische Molkerei-Ztg. Jg. 34. 1913. p. 471, 494.)

Im Auftrage der Vereinigung der städtischen Milchgroßbetriebe Deutschlands E. V. prüfte Verf. das bereits durch vorausgehende Referate bekannte Lobecksche Milchentkeimungsverfahren in der Praxis.

Als Vorzüge ihres neuen Milchbehandlungsverfahrens, des Biorisatorverfahrens nach Dr. Lobeck zur Gewinnung einer keimarmen, einwandfreien Milch mit dem Charakter der Rohmilch, bezeichnet die Gesellschaft für Molkereifortschritte in Leipzig in ihrer Ankündigung:

Kein Kochgeschmack der Milch.
Keine Stallgase und Gerüche.
Keine Homogenisierung.
Keine Schädigung der chemischen und biologischen Eigenschaften.
Keine Gerinnung der Eiweißstoffe.
Aussehen, Geruch und Geschmack von bester Rohmilch.
Gleiche Aufrahmfähigkeit (bereits durch „keine Homogenisierung" gekennzeichnet).
Größere Haltbarkeit.
Befreiung von Bakterien, namentlich der Krankheitserreger.
Bessere Milchprodukte und anderes mehr.

Das Verfahren wurde in zwei Meiereien ausprobiert, in einer Düsseldorfer mit 1000 und einer Leipziger mit 250 l Stundenleistung. Die Biorisatoranlage ist genau beschrieben.

Verf. resumiert bezüglich der bei 72—76° C biorisierten Milch:

Färbung und Aussehen sind die einer normalen Rohmilch.

Geruch und Geschmack sind rein und normal rohmilchartig; irgendein Stall- oder Kochgeschmack und Geruch sind nicht vorhanden.

Die Aufrahmfähigkeit ist die normaler Rohmilch (?).

Die originären Milchenzyme — Peroxydasen — sind unverändert geblieben, die durch Bakterienwirkung in der Milch erzeugten Enzyme — Katalase und Reduktase — sind abgeschwächt.

Die Labfähigkeit der Milch ist zeitlich etwas verzögert, sonst jedoch in vollem Umfange aufrechterhalten.

Ausscheidung von Milcheiweiß (Albumingerinnsel) wurde nicht beobachtet.

Die vegetativen Formen der Bakterien sind abgetötet, nur vereinzelte resistente Sporen der Erd- und Heubazillen werden nicht vernichtet. Alle pathogenen Keime werden mit Sicherheit unschädlich gemacht.

Die Haltbarkeit biorisierter Milch übertrifft die roher und pasteurisierter bedeutend.

Das Biorisator-Milchentkeimungsverfahren entspricht also nach Verf. den gegebenen Ankündigungen. Auf die Rentabilität ist nicht näher eingegangen. Die Reinigungsmöglichkeit der Apparate soll eine leichte und bequeme sein. Wolff (Kiel).

Skar, Olaf, Verhalten der Leukocyten der Milch bei der Methylenblaureduktaseprobe. (Zeitschr. f. Fleisch- u. Milchhyg. Bd. 23. 1913. p. 442.)

Verf. tritt der Auffassung entgegen, daß die Reduktase der Kuhmilch ausschließlich bakterieller Natur sei. Nach seinen Untersuchungen sind auch die Leukocyten der Milch an der Reduktion von Methylenblau beteiligt. Aus verschiedenen Versuchen sei der folgende herausgegriffen: Aus der Zitze einer Kuh wurden vier Portionen Milch in sterile Gläser aufgefangen und zwar 1. die ersten Milchstrahlen, 2. die direkt darauf ermolkene Milch, 3. Milch aus der halb entleerten Zitze, 4. die allerletzte Milch. Die Milch wurde bei 38° unter ständiger Bewegung zur Vermeidung einer Sedimentierung, mit Methylenblau versetzt, gehalten. Die Ergebnisse waren folgende:

No. der Milchprobe	Tromms-dorffsche Probe Vol. $^0/_{00}$	Zahl der Leukocyten in 1 ccm	Entfärbungszeit	Mikroskopischer Befund des Zentrifugenbodensatzes der entfärbten Milch nach 23 Std. Bebrütung
1	0,35	586 500	ca. 17 Std.	Sehr reich an verschiedenen Bakterien
2	0,30	510 000	ca. 19 Std.	Reich an verschiedenen Bakterien
3	1,1	3 009 000	etwas mehr als 12 Std.	Sehr wenig Bakterien
4	2,1	6 706 000	8—9 Stunden	Fast keine Bakterien zu entdecken.

Daß die abnehmende Entfärbungszeit auf Rechnung der Leukocyten zu setzen ist, geht daraus hervor, daß sterilisierte Milch, mit Leukocyten aus einer Lymphdrüse eines Rindes versetzt, je nach dem verschiedenen Leukocytengehalt verschieden rasch entfärbte und daß gefärbte Leukocyten ebenfalls entfärbten. Grimmer (Dresden).

Kern, H., u. Müller, E., Über eine vereinfachte Herstellung der Eiweißmilch. (Berliner klin. Wochenschr. 1913. No. 48.)

Nach Einführung der von Finkelstein und L. F. Meyer angegebenen Eiweißmilch wurden noch weitere Verbesserungsvorschläge gemacht. Nun haben auch Kern und Müller im Großen Friedrichs-Waisenhause, Rummelsburg, nach vielen Versuchen ein Verfahren zur Darstellung zusammengestellt, welches die verschiedenen Vorteile anderer Methoden, so unter anderen der von M. K. Forcart, vereinigt, und den Vorzug der Einfachheit, Billigkeit und Leistungsfähigkeit besitzt. Hiernach wird ein Liter gewöhnlicher Buttermilch mit ebensoviel Wasser gemischt, unter Rühren aufgekocht und nach dem Kochen mit Wasser wieder auf das Volumen von 2 l aufgefüllt. Beiseite gestellt hat sich dann nach etwa 30 Minuten eine genügend klare Molke gebildet, von welcher etwa 1125 g abgenommen werden. Der zurückbleibende Molkenrest mit dem Kaseïnsatz wird zur Erhaltung des normalen Fettgehaltes mit 125 g 20-proz. Sahne auf 1 l aufgefüllt. Dies ist die zusatzfreie Eiweißmilch; nach Verordnung wird dann der Zuckergehalt auf 3, 5, 7 und mehr Prozent Zucker gebracht. Die Analyse ergab im Liter:

Eiweiß	Fett	Kohlenhydrat	Asche	P_2O_5	CaO
26,5	29—31 nach Gerber	—	3,96	1,24	0,833
		Verglichen mit Eiweißmilch:			
31,9	20—25	12—16	4,09	1,33	0,960

Es ist also eine Milch mit vollem Kaseïn- und Fettgehalt mit der Hälfte der Molke; sie teilt mit der Eiweißmilch von Finkelstein und Meyer den Vorteil des Gehaltes an Buttermilch. — Einzelheiten für die praktische Herstellung im großen sind aus dem Original zu ersehen. Dem Bericht nach wird diese Milch gern von den Kindern genommen.

Rullmann (München).

Grimmer, Über den Wert der biologischen Milchuntersuchungsmethoden. (Milchw. Zentralbl. Jg. 42. 1913. p. 580.)

Die biologischen Untersuchungsmethoden der Milch versuchen in erster Linie folgende drei Punkte zu beantworten:

1. Die Herkunft einer Milchart.
2. Den Nachweis einer stattgehabten Erhitzung.
3. Die Frage nach der Genußfähigkeit resp. Unschädlichkeit der Milch für den Menschen.

Praktisch wichtig ist bei erstgenanntem Punkte nur die Unterscheidung der Eselinnenmilch von der Frauenmilch, da erstere zuweilen als Ersatz in den Handel kommt. Man untersucht durch die Präzipitinreaktion, die Komplementbindungsmethode und die anaphylaktische Methode. Für die Milchkontrolle kommen derartige Methoden nicht in Betracht.

Weiterhin ist über den Nachweis einer stattgehabten Erhitzung der Milch durch die bekannten Enzymreaktionen gesprochen. Die Guajak-Reaktion wird negativ, sobald die Milch für 1 Minute auf 75° C oder 10 Minuten auf 72° C erhitzt wurde, während eine Erhitzung auf 70° selbst nach vier Stunden keine Vernichtung des Fermentes zur Folge hat. Die Storchsche und Rothenfußersche Mischung gestatten den Nachweis, daß die Milch mindestens für 1 Minute auf 78—80° oder 5 Minuten auf 75° erhitzt wurde. Schon im Jahre 1820 beobachtete Planche, daß die Guajak-Tinktur durch rohe Milch gebläut wird, nicht aber durch gekochte. Die Schardingersche Reaktion erscheint Verf. ungeeignet; wenn Verf. aber sagt, es hätte wohl kaum jemand ein Interesse daran, eine erhitzte Milch roh erscheinen zu lassen, während der umgekehrte Fall aus leicht begreiflichen Gründen eher denkbar ist, so entspricht das nicht immer der Praxis, die gleichwohl zuweilen erhitzte Milch als roh erscheinen lassen möchte. — Interessant sind die gleichzeitig erwähnten historischen Daten über ein gesuchtes Mittel zur Erkennung „schädlicher“ Milch.

Es ist Schmutzbestimmung, Keimzählung, Alkoholprobe, Säureprüfung, Gärprobe, Labgärprobe, die Reduktase- und Katalaseprobe erwogen, ausführlicher die Katalase- und Reduktaseprüfung in Anwendung auf Mastitis- und Kolostratmilch, unter Hinweis auf die Wichtigkeit derartiger biologischer Prüfungsmethoden mit dem Ziele, vielleicht schon zu einer Zeit, da eine klinische Diagnose nicht gestellt werden konnte, an den feinen Veränderungen der Milch, die durch eine kaum wahrnehmbare Störung der Drüsenfunktion bedingt wurden, ein im Entstehen begriffenes Leiden zu erkennen und rechtzeitig Vorbeugungsmaßregeln ergreifen zu können. Es besteht aber bei diesen Untersuchungen ein wohl beachtenswerter Parallelismus zwischen Kolostrum- und Mastitismilch, der sicher durch die gleiche Eigenschaft der Milchdrüse, eine mangelhafte Funktion derselben, bedingt wird, lediglich mit dem Unterschied, das es sich im ersteren Falle um eine rein physiologische Erscheinung handelt, in dem Sinne zu deuten, daß die Milchdrüse zu Beginn der Laktation ihrer Aufgabe, Milchbestandteile zu produzieren, noch nicht völlig gewachsen ist und diese Fähigkeit erst nach einiger Zeit erwirbt, während andererseits bei Euterentzündungen die mangelhafte Funktion durch schwere Eingriffe in die normale Beschaffenheit des Drüsengewebes bedingt wird.

Was den praktischen Nutzen aller Enzymreaktionen anbetrifft, so hat nach Verf. die Erfahrung der letzten Jahre gezeigt, daß sie fast ausnahmslos im Stiche lassen. Für die Beurteilung der Marktmilch hat die Katalaseprobe z. B. überhaupt keinen Wert, da die natürlichen Schwankungen normaler Milch in ihrem Enzymgehalt immerhin in relativ weiten Grenzen schwanken und demgegenüber die Abweichungen selbst in einer schon weitgehend veränderten Milde nicht so groß sind, daß sie auch noch in Mischmilch, die von der kranken Milch vielleicht nur einen ganz geringen Prozentsatz enthält, sich bemerkbar machen könnten. Nur die Trommsdorffsche Leukocytenprobe ist in der Ausführungsart nach Ernst unter Zuhilfenahme der bakterioskopischen Prüfung bewährt. Die Labhemmprobe nach Schern scheint sich zur Beurteilung von Einzelmilchproben vielleicht zu eignen, ob sie aber für die Beurteilung von Handelsmilch von irgendeinem Werte ist, muß sich erst erweisen. Die Kulturmethode ist die beste, leider aber für ständige Kontrolle zu zeitraubend. Am zweckmäßigsten ist die Stallkontrolle, die in einfacher und schneller Methode innerhalb kurzer Zwischenräume erfolgen soll, das ist nach Verf. zurzeit allein die Trommsdorffsche Leukocytenprobe und die Labhemmprobe von Schern. — Ob übrigens die Kombination der Reduktaseprobe mit der Gärprobe nach O. Jensen als ein Vorteil zu betrachten ist, bleibt nach Verf. noch abzuwarten.
Wolff (Kiel).

Larsen, C., White, Wm. and Fuller, J. W., Preliminary report on the milking machine. (So. Dakota Agr. Exp. Stat. Bull. 144. 1913. p. 205—232.)

Under all conditions of the investigation the machine-drawn milk contained more bacteria than that drawn by hand. The bacterial content of the machine-drawn milk was reduced by submerging the rubber parts of the machine between milkings in an antiseptic solution. A five per cent solution of calcium chloride saturated with sodium chloride is recommended for this purpose. The bacterial content of the milk was materially reduced by drawing the air into the pails through cotton filters.
Rogers (Washington).

Auzinger, A., Die Alkoholreaktion der Milch. (Molkerei-Ztg., Hildesheim. Jg. 28. 1914. p. 457.)

Verf. weist auf seine früheren Untersuchungen hin (Milchw. Zentralbl. 1909. H. 7, 8, 9 u. 10 und Molk.-Ztg. Berlin 1911. No. 4). Die Alkoholgerinnung der Milch steht im wesentlichen mit den Kalksalzen der Milch in Zusammenhang und ist daher Schwankungen unterworfen. Setzt man frischer Milch 0,05—0,06 Proz. $CaCl_2$-Lösung zu, so gerinnt sie bei Alkoholzusatz; das Gegenteil ist der Fall bei Zusatz kalkfällender Mittel, sowie nach Erhitzen (über 70° C), Verwässerung und Abstehenlassen (ohne spontane Säuerung). So dürfte die Alkoholgerinnung von der kalkhaltigen Fütterung abhängig sein. Die doppelte Alkoholprobe ist jedenfalls für das Höhenvieh zu stark, selbst für Mischmilch angewendet.

Zur praktischen Beurteilung der einfachen Alkoholprobe mit 68-proz. Alkohol für Mischmilch wäre folgendes zu beachten:

Tritt keine Gerinnung ein, so ist die Milch so wenig in der Säuerung fortgeschritten, daß sie, bei 12—16° C aufbewahrt, das Kochen noch wenigstens 1—2 Stunden verträgt. Bei Mischmilch erfolgt mit 68-proz. Alkohol aber Gerinnung, wenn sie etwa 8—9 Aziditätsgrade nach Soxhlet-Henkel hat, während beim Aufkochen eine Milch erst bei etwa 10 Säuregraden gerinnt.

Für Einzelmilch sind die Verhältnisse zur Beurteilung der Alkoholprobe viel schwieriger. Nach Verf. Erfahrung gerinnen auch frische Einzelmilchen unabhängig vom Säuregrad nicht selten, und zwar:

a) von frischmelkenden Kühen, auch häufig noch am Ende der Kolostralperiode, wenn der Säuregrad bereits wieder im normalen Mittel schwankt,

b) von altmelkenden Kühen gegen Ende der Laktation, wo häufig der Säuregrad erniedrigt ist,

c) fast stets längere Zeit von Kühen, die verkalbt haben,

d) von Kühen, die euterkrank sind oder waren.

Setzt man einer normalen Sammelmilch eine geringe Menge frische Lablösung zu und macht sofort darauf die Alkoholprobe mit 68-proz. Alkohol, so entsteht ein grobflockiger Niederschlag, eine Bestätigung für die Annahme, das Lab sogleich die Milch verändert und die Calciumsalze nicht an und für sich die Fähigkeit haben, Parakaseïn zu fällen, sondern daß erst das Lab die Calciumsalze freimacht.

„Bestimmte Relationen zwischen dem Ausfall der Alkoholprobe und den Fermentreaktionen, Reduktase, Katalase, Diastase, lassen sich nicht feststellen.“ In vielen Fällen zeigen jedoch anormale Milchen, die Formalin-Methylenblau viel schneller als sonst, manchmal schon sofort bei gewöhnlicher Temperatur, entfärben, auch eine Alkoholgerinnung mit 70-proz. Alkohol.

Die „Alkoholzahl“ nach Löhnis käme zu praktischen Zwecken mehr für Mischmilch als für Einzelmilch in Betracht, da letztere in ihrem Verhalten zu Alkohol sehr großen Schwankungen unterworfen ist. Der Vorschlag Löhnis', die einfache und doppelte Alkoholprobe bei Verwendung von verschiedenen Alkoholkonzentrationen viel ausgedehnter als bisher anzuwenden, ist aber nach alledem sehr begrenzt. Die Säuretitration erscheint nicht schlechter, sogar zuverlässiger. Wünschenswert wäre eine Verständigung über die Angabe der Gerinnungsstärke bei der Alkoholtitration, die bislang entweder durch sehr feinflockig bzw. grobflockig oder durch Zahlen 1, 2, 3, 4 usw. bei Reagierglasproben festgestellt wurde. Wenn die „Alkoholzahl“ vielleicht auch bei Mischmilch nicht den erwarteten Dienst leistet, so entdeckt sie doch in Anwendung auf die Einzelmilch viel Interessantes und Wissenswertes. Wolff (Kiel).

Löhnis, F., Die Titration der Milch mit Alkohol von verschiedener Konzentration. (Molkerei-Ztg., Hildesheim. Jg. 28. 1914. p. 153.)

Verf. baut die Alkoholtitration zu einer brauchbaren Methode der Prüfung von Milch auf ihre Güte bzw. Beschaffenheit aus. 2 ccm Milch von 15—20° C wurde mit 80 volum-prozentigem Alkohol titriert; die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter ist die „Alkoholzahl“, die Konzentration des Alkohols (70 oder 90 seltener) ist stets anzugeben.

Titriert man die frisch ermolkene Milch einzelner Kühe, so ergeben sich sehr weit abweichende und zum Teil recht überraschende Alkoholzahlen. Bei manchen Kühen sind sie lange Zeit hindurch andauernd hoch, bei anderen niedrig (dies bekanntermaßen namentlich im Anfang der Laktation); nicht

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

selten aber zeigen sich merkwürdige und interessante Schwankungen von Tag zu Tag. Zahlen legen dies dar. Z. B. wurden im Juni im Minimum 2,1, im Maximum 9,2, im Juli 2,7 bzw. 8,6 gefunden. Witterungsverhältnisse und Temperatur beeinflussen die Alkoholzahl. Im ganzen sind, wie zu erwarten war, die Alkoholzahlen für die Mischmilch viel einheitlicher als für die Einzelmilch.

Inwiefern das Zu- und Abnehmen der Alkoholzahlen mit Änderungen in der chemischen Beschaffenheit der Milch Hand in Hand gehen, muß vorläufig dahingestellt bleiben. Auch andere Verhältnisse sind noch nicht aufgeklärt und bedürfen des Studiums. Immerhin kann die Alkoholtitration der Milch in chemischer, physikalischer und bakteriologischer Hinsicht manche wissenschaftlich wie praktisch wichtige Auskunft über die Beschaffenheit der Milch geben.

In Tabelle 4 sind 73 Proben auf Keimzahl, Reduktionszeit und Alkoholzahl (70, 80 und 90) nebeneinander geprüft und lassen sich folgende Regeln für Mischmilch ableiten:

1. Niedriger Keimgehalt: mehr als 4 ccm, 80-proz. Alkohol.
2. Mittlerer Keimgehalt: 2—4 ccm 80-proz. Alkohol.
3. Hoher Keimgehalt: weniger als 2 ccm 80-proz. Alkohol.
4. Sehr hoher Keimgehalt: weniger als 2 ccm 70-proz. Alkohol.

Im Vergleich mit der Reduktaseprobe nach Jensen und Barthel ergibt sich Übereinstimmung der Alkohol- und Reduktionszahl:

	I.	II.	III.	IV.
Reduktionszeit . .	> 5½ Std.	5½—2 Std.	2 Std. bis 20 Min.	< 20 Min.
Keimgehalt	> 500 000	0,5—4 Millionen	4—20 Millionen	> 20 Millionen

Die Alkoholprobe scheint Vorteile gegenüber der Reduktaseprobe aufzuweisen, so führt sie auch bedeutend schneller zum Ziele und gibt zugleich Auskunft über die Haltbarkeit der Milch.

Zwischen verbrauchten Alkoholmengen verschiedener Konzentration bestehen keine ganz festen Beziehungen. Besonders stellen sich auch bei der Titration erhitzter Milch eigenartige Differenzen für 90- und 80-proz. Alkohol heraus, die noch näher verfolgt werden müssen. Es ist möglich, daß die Temperatur von Milch und Alkohol genau auf 15° C eingestellt werden muß.

Wolff (Kiel).

Morres, W., Warum ist die Alizarolprobe wertvoller als die Alkoholprobe? (Molkerei-Ztg., Berlin. Jg. 24. 1914. p. 143.)

1. Die Alizarolprobe zeigt die Säuregrade der Milch viel genauer und deutlicher an als die Alkoholprobe, weil nicht nur mit dem Säuregehalt zunehmende Flockenstärken, sondern auch entsprechende Farbenänderungen eintreten, die den Säuregrad viel besser und sicherer erkennen lassen als die Größe der Gerinnungsflocken.

2. Die Flockenstärke für sich allein bei der Alkoholprobe ist ein viel weniger zuverlässiges Kennzeichen eines bestimmten Säuregrades als der Farbenton, weil bei vielen Milchproben eine feinflockigere Gerinnung eintritt, als nach dem Säuregrad zu erwarten wäre.

3. „Labgärung“ und „Säurelabgärung“, die die Haltbarkeit der Milch viel rascher beeinträchtigen, sind mit anderen Verfahren viel schwerer und umständlicher zu erkennen als mit der Alizarolprobe.

4. Die Alizarolprobe vermag auch frische Milch von abnormer Beschaffenheit, z. B. von euterkranken Kühen, durch besondere violette Farbentöne, ferner durch Natron neutralisierte, sauer gewesene Milch nachzuweisen.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

5. „Die Alizarolprobe ist nicht zu verwechseln mit der alten Alizarinprobe von Engling, welche ein rein qualitatives Verfahren ist und auch darin sehr Unvollkommenes leistet, während die Alizarolprobe ein qualitatives und quantitatives Verfahren darstellt, welches mit einer für die Praxis vollkommen ausreichenden Genauigkeit arbeitet und für diese gleich zwei Untersuchungsverfahren, nämlich das Titrierverfahren und die Alkoholprobe, zugleich zu ersetzen vermag.“ Wolff (Kiel).

Tillmans, J., Splittgerber, A. u. Riffart, H., Über Bestimmung und Bedeutung des Ammoniakgehaltes der Milch. (Zeitschrift f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel usw. 1914. H. 1/2. p. 59—76.)

In eingehender Weise haben die Verff. die bisher benutzten Untersuchungsmethoden in ihren Vorzügen und Mängeln besprochen. Bei den eigenen Untersuchungen haben sie versucht, die noch lückenhaften Methoden zu verbessern und sind ganz besonders an das Studium der Ammoniakfrage herangetreten. Bei diesem Ammoniakbestimmungsverfahren finden sich die Abschnitte über Ausfällung als Ammoniummagnesiumphosphat und Destillation, dann Bedeutung des Ammoniakgehaltes der Milch, Ammoniakgehalt frischer Milch, Einfluß der Säuerung auf den Ammoniakgehalt, Ammoniak in erhitzter, verschmutzter und gewässerter Milch. Von ganz besonderem Interesse für den Leser des Centralbl. f. Bakter. Abt. II ist der Zusammenhang zwischen der bakteriologischen Beschaffenheit der Milch und dem Ammoniakgehalte. Es steht fest, daß der NH_3-Gehalt frischer Milch nur wenige Milligramm im Liter beträgt und daß er mit fortschreitender Zersetzung der Milch zunimmt; danach schien es den Verf. zunächst erforderlich, den Zusammenhang zwischen der bakteriologischen Beschaffenheit der Milch und ihrem NH_3-Gehalt zu ermitteln. Eine unbedingte Parallelität kann aber zwischen beiden nicht erwartet werden, weil in der Milch immer sehr zahlreiche Mikroorganismenarten vorkommen und es rein zufällig ist, welche Art prädominiert. Dann ist auch das NH_3-Bildungsvermögen der einzelnen Arten sehr verschieden, so daß die Keimzahl nicht immer eine Übereinstimmung mit dem NH_3-Gehalt erwarten läßt. Wenn auch eine Bestimmung der einzelnen Arten in diesem Falle untunlich war, so konnten doch neben der absoluten Keimzahl die zur Coligruppe gehörigen Organismen festgestellt werden. Die tabellarisch zusammengestellten Resultate sind auf p. 74—75 angegeben und seien die Interessenten dringend hierauf verwiesen. In nachstehenden Sätzen sind die Ergebnisse von den Verff. zusammengefaßt:

1. Für die Bestimmung des NH_3-Gehaltes der Milch empfiehlt es sich, zunächst den allergrößten Teil der eiweißhaltigen Substanzen zu entfernen. Das mit Sublimat-Salzsäure resp. Bleiessig-Natriumphosphat hergestellte Serum erwies sich für unsere Untersuchungen als geeignet. Außer durch Vakuumdestillation, die umständlich ist, kann man den NH_3-Gehalt der Milch nach einem von uns angegebenen Verfahren in der Weise bestimmen, daß man das Bleiessigserum unter gewissen Bedingungen mit Magnesiumchlorid und Natriumphosphat versetzt. Der abzufiltrierende Niederschlag von Magnesiumammoniumphosphat wird samt Filter in Wasser aufgeschwemmt und der Destillation mit Magnesia bei gewöhnlichem Druck unterworfen. Die Parallelbestimmung mit der Vakuummethode ergaben immer ausgezeichnete Übereinstimmungen.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

2. Auch frische Milch, wie sie das Euter der Kuh verläßt, enthält geringe (3—4 mg im Liter) NH_3-Mengen und 3. mit fortschreitender Zersetzung der Milch nimmt der NH_3-Gehalt ständig zu.

4. Durch das Erhitzen der Milch wird der Gehalt an NH_3 nicht verändert; es entstehen aber NH_3-haltige Stoffe, welche bei der Ausfallmethode mit abgeschieden werden und dann bei der Destillation bei gewöhnlichem Druck NH_3 abspalten, so daß in erhitzter Milch nach dieser Methode höhere Werte für den NH_3-Gehalt erhalten werden als bei der Vakuumdestillation. Im übrigen steigt auch beim Aufbewahren von erhitzter Milch der NH_3-Gehalt langsam an.

5. Paralleluntersuchungen von normaler und künstlich mit Kuhkot verschmutzter Milch ergaben, daß geringe Mengen Kuhkot nicht imstande sind, sofort den NH_3-Gehalt zu erhöhen. Bei mehrtägigem Aufbewahren war jedoch der NH_3-Gehalt der verschmutzten Milch bedeutend höher als der der unverschmutzten Milch von demselben Alter.

6. Für einen Nachweis von Milchwässerungen mit unreinem Wasser hat der NH_3-Gehalt der Milch keine Bedeutung.

7. Untersuchungen von Handelsmilch ergaben, daß Säuregrad, Alkoholprobe und Methylenblauprobe, letztere indessen wohl in extremen Fällen, keinen Aufschluß über einen hohen Gehalt an Bakterien zu geben vermögen. Hingegen zeigte ein hoher NH_3-Gehalt die schlechte bakterielle Beschaffenheit deutlich an. Die Bestimmung des NH_3-Gehaltes ist also ein Mittel zur schnellen Feststellung der bakteriellen Beschaffenheit einer Milch.

8. Nach den bisherigen Untersuchungen ist Milch, welche über 10 mg NH_3 im Liter enthält, als im erheblichen Maße bakteriell verunreinigt zu betrachten. Die NH_3-Bestimmung dürfte für Vorzugsmilch, wie Säuglings- und Krankenhausmilch, von Bedeutung sein. Rullmann (München).

Perfiliev, B., Ein Schlammsauger zur Gewinnung der Bodenmikroflora und -fauna. (Bull. du jard. impér. botan. de St. Petersbourg. XIII. 1913. p. 45—51.) [Russisch mit deutschem Resumé.]

Der neue vom Verf. konstruierte Apparat beruht auf einem anderen Prinzipe als der von Zacharias angegebene: Ein nach unten gerichtetes breites U-ähnliches metallisches Rohr, dessen langes knieförmiges Ende schräg abgeschnitten ist; durchs kürzere Rohrknie ist ein Rohr von geringerer Breite nach oben durchgeführt, auf das ein Gummirohr von derselben Länge, das der bestimmten Tiefe entspricht, aufgezogen wird. Das kürzere, mit dem äußeren Gummiumschlag versehene Ende des Apparates wird in den Hals der Glasbüchse, woselbst die Probe bis zur weiteren Aufbewahrung bleibt, dicht hineingestellt. Nach der Einklemmung des Gummirohres läßt man den Schlammsauger auf einer Schnur bis zum Boden hinunter, worauf das Rohr geöffnet wird. Durch den Druck der höher liegenden Wasserschichten wird die Büchse mittels des U-ähnlichen Rohres mit halbflüssigem oberflächlichen Schlamm gefüllt. Große Schnelligkeit und Sauberkeit in der Arbeit zeichnet den Apparat aus. Er ist auch billiger als der von Zacharias.

Matouschek (Wien).

Brown, P. E., A new Method for the bacteriological Examination of Soils. (Science. Vol. 38. 1913. p. 413.)[1]

Previous methods are objected to because of the use of sterilized or air dry soil as media and the dilution method. Fresh soil is the logical medium to be employed. Satisfactory results were secured by using fresh soil with ammonium sulphate for nitrification and fresh soil with mannite for azofication. For ammonification more difficulty was experienced in selecting suitable nitrogenous material to permit the accumulation of ammonia in sufficient amounts to be measured. Comparisons of the results obtained using air dry soil and infusions of fresh soil and dried blood, albumen and casein with those secured using fresh soil brought out the greatest differences in the ammonifying power of the soils and possessed also certain other advantages incident to manipulation. The method recommended consists in testing fresh soil obtained as described in previous work by the writer, adding a solution of ammonium sulphate for nitrification, and mannite for nitrogen fixation.

---

[1] Vgl. auch diese Zeitschr. Abt. II. Bd. 39. p. 61; Bd. 40. p. 169.

P. G. Heinemann (Chicago).

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien etc.

Aumann u. Storp, Über die Sterilisation kleiner Trinkwassermengen durch Chlorkalk, mit Berücksichtigung der militärischen Verhältnisse. (Deutsche med. Wochenschr. 1914. No. 6.)

Infolge der wichtigen Aufgabe, die Truppen im Felde und auch jeden einzelnen Soldaten stets mit gesundem Wasser versorgen zu können, sind schon viele, meist nicht befriedigende Versuche gemacht worden. Neuerdings haben die Verff. ein von Bayer & Co. angegebenes Verfahren in kriegsministeriellem Auftrage geprüft und die dazu erforderlichen Zusätze zu dem zu reinigenden Wasser von genannter Fabrik erhalten. Die Grundbedingung der Haltbarkeit der Reagentien war scheinbar erfüllt, bis längere Beobachtungen das Gegenteil bewiesen. Der eine Körper, Chlorkalk, dessen sterilisierende Wirkung vielfach bereits anderweitig verwendet wird, war nach den Untersuchungen der Verff. innerhalb drei Monaten sehr erheblich und ziemlich gleichmäßig in seinem Chlorgehalt zurückgegangen, während der andere Körper, Natriumkarbonat, in seinem Gehalt an wirksamer Substanz sehr ungleichmäßig, teilweise fast ganz zersetzt war; während der Lagerung hatten sich die die Glasröhrchen schließenden Korkstopfen gelockert und jedenfalls hierdurch zur Zersetzung beigetragen.

Die von den Verff. ausgeführten einleitenden Versuche bestanden darin, daß sie 3 l Wasser mit dem Inhalte eines Chlorkalkröhrchens beschickten und dann die bestimmte Menge Natriumkarbonat (Antichlor) zusetzten. Nach lebhafter Gasentwicklung entstand unter Opaleszenz ein milchig-weißes Aussehen. Die ersten Proben nach der Filtration ergaben ein klares, fast geruchloses Wasser, das weich, aber laugig, entgegen den Angaben der Firma, schmeckte. Nach genauer Prüfung des Verlaufes der Reaktion unter Verwendung verschieden harten Wassers war anfangs weder Geruch noch Geschmack nach Chlor bemerkbar, aber nach dreimonatigem Stehen war solches festzustellen; es war ungenießbar geworden, wie solches auch von unbeteiligten Personen bestätigt wurde.

Die Verff. stellten folgendes Schlußergebnis fest:

1. Der Gehalt des Chlorkalkgemisches an wirksamen Chlor erschien bei den ersten Untersuchungen geringer, als von der Firma angegeben. Der

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Gehalt des Antichlors an wirksamem Perkarbonat betrug im Mittel rund 60 Proz.

2. Ein mit frisch gelieferten Reagentien behandeltes Wasser war nach dem Filtrieren klar, von alkalischer Reaktion; es besaß oxydierende Eigenschaften, bedingt durch Überschuß von Antichlor. Es war fast kalkfrei; bei natürlichem Wasser nahm die Härte durch die Behandlung erheblich ab.

3. Nach dreimonatigem Lagern war der Gehalt der Chlorkalkmischung an wirksamen Chlor um rund 2,5 Proz. zurückgegangen. Der Gehalt des Antichlors an wirksamen Natriumperkarbonat war in den einzelnen Röhrchen sehr ungleichmäßig, teilweise war das Salz fast vollständig zersetzt.

4. Ein mit diesen Reagentien behandeltes Wasser riecht und schmeckt nach Chlor und ist als Trinkwasser unbrauchbar.

5. Schon allein bei dieser nachgewiesenen Inkonstanz des Desinfiziens läßt sich eine sichere Gewähr für sichere Keimabtötung nicht geben. Um so schwerer fällt jetzt der Umstand ins Gewicht, daß wir stets die wechselnde Zusammensetzung der Oberflächenwässer mit zu berücksichtigen haben.

6. Zur Gewinnung genußfertigen Trinkwassers ist Filtration des behandelten Wassers unumgänglich.

7. Für Feldverhältnisse ist das Verfahren abzulehnen, denn der Geschmack des gewonnenen Wassers ist nicht einwandfrei; die erforderliche Filtration gestaltet das Verfahren zeitraubend und umständlich, und eine wirksame Sterilisation kann nicht für alle Fälle gesichert erscheinen.

Rullmann (München).

Neue Literatur,

zusammengestellt von

Prof. Dr. Otto Hamann,

Oberbibliothekar der Kgl. Bibliothek in Berlin.

Untersuchungsmethoden, Instrumente usw.

Rochaix, A., Nouveaux milieux solides végétaux pour les cultures microbiennes. (Journal de physiol. et de pathol. gén. T. 15. 1913. No. 6.) p. 1172—1177.

Rothert, Über den Einfluß der Aussaatstärke auf das Resultat bei Bakterienzählungen mittels Plattenkulturen. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 1914. Bd. 4. H. 1. p. 1—10)

Systematik, Morphologie.

Saccardo, P. A., Notae mycologicae. Series 17. (Ann. Mycol. Vol. 11. 1913. No. 6. p. 546—568.)

Sydow, H. and **P.,** Enumeration of Philippine fungi with notes and descriptions of new species 2. (Journal of sc. C. Botany. Vol. 8. Philippine 1913. No. 6. p. 475—508, 7 Fig.)

Theissen, F., Über einige Mikrothyriaceen. (Ann. Mycol. Vol. 11. 1913. No. 6. p. 493—511. 1 Taf. u. 7. Fig.)

Vayssière, P., Cochenilles nouvelles de l'Afrique française. (Rev. phytopathol. appliquée. 1913. No. 9. p. 124.)

Vuillemin, Paul, Genera Schizomyceten. (Ann. Mycol. Vol. 11. 1913. No. 6. p. 512—527.)

Biologie.

Beijerinck, M. W., De infusies en de ontdekking der bakterien. (Jb. kon. akad. v. wetensch., 1913. p. 1—28; geïll.)

Blochwitz, Adalbert, Entstehung neuer Arten von Schimmelpilzen durch starke Lichtreize. (Ber. d. Deutschen bot. Ges. Jg. 32. 1914. H. 2. p. 100—105, 2 Fig.)

van der Byl, Paul A., The nature of fungi, with reference to the life-histories of some important parasites. (Agric. Journal Union South Africa. Vol. 6. 1913. No. 6. p. 904—922, 25 Fig.)

Diedicke, H., Noch einige „Leptostromaceen", die Nectrioideen, Excipulaceen und Melanconieen. (Ann. Mycol. Vol. 11. 1913. No. 6. p. 528—545.)

Franzen, Hartwig, Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. 8. Mitt. Über die Vergärung der Ameisensäure durch Bacillus Plymouthensis in konstant zusammengesetzten Nährböden. (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88. 1913. H. 2. p. 73—102.)

Goddard, H. N., Can fungi living in agricultural soil assimilate free nitrogen? (Bot. Gazette. Vol. 56. 1913. No. 4. p. 429—305, 18 Fig.)

Graf, G., Die Hefe als Nahrungsmittel. (Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabrikat. Jg. 42. 1914. No. 6/7. p. 54—55.)

Keilin, D., Sur la biologie d'un Psychodide à larve xylophage Trichomya urbica Curtis (Diptère). (Compt. rend. Soc. Biol. T. 76. 1914. No. 10. p. 434—437, 2 Fig.)

Klöcker, Recherches sur les organismes de fermentation. (Compt. rend. de travaux du Labor. de Carlsberg. Vol. 10. 1913. Livr. 2. p. 207—226; Livr. 3. p. 285—346, 8 Taf.)

Lafforgue, Les traitements d'hiver des parasites de la vigne. (Rev. de viticult. Année 21. 1914. No. 1055. p. 259—263.)

Loos, Kurt, Beobachtungen über Borkenkäfer. (Centralbl. f. d. ges. Forstwesen. Jg. 39. 1913. H. 8/9. p. 405—414.)

Oudemans, A. C., Acarologische aanteekeningen L I. (Entomol. Ber., Dl. 4 [1913—14]. p. 53—59.)

—, Acarologische aanteekeningen L II. (Entomol. Ber., Dl. 4 [1913—14]. p. 65—73.)

Rubner, Max, Über Hefeforschung. Originalreferat v. Robert Heuß. (Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabrikat. Jg. 42. 1914. No. 8/9. p. 72—75.)

Schiller, Ignace, Sur les produits des microbes en association. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 73. 1914. H. 2. p. 123—127.)

Schmidt, Hugo, Einige Notizen über das Zusammenleben von Gallinsekten und Pilzen an einheimischen Pflanzen. (Fühlings landw. Ztg. 1914. H. 4. p. 143—146.)

Tamura, Sakae, Zur Chemie der Bakterien. 2. Mitt. (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88. 1913. H. 3. p. 190—198.)

Visser, J. M., Bacteriën, schimmels, wieren en protozoën. (Suikerindustrie. Jg. 14. [1914]. p. 39—55.)

Weese, Josef, Studien über Nectriaceen. (Zeitschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 4. 1914. H. 2. p. 90—132, 2 Fig.)

Wehmer, C., Versuche über die Bedingungen der Holzansteckung und -zersetzung durch Merulius (Hausschwammstudien 4). (Mykol. Centralbl. Bd. 3. 1914. H. 7. p. 321—332, 1 Fig.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zur unbelebten Natur.

Luft, Wasser, Boden.

Ebert, F. A., Über Wassersterilisierung mittels ultravioletter Strahlen des Quecksilberdampflichtbogens. (Gesundheits-Ingenieur. Jg. 37. 1914. No. 10. p. 170—171, 5 Fig.)

Gärtner, Über den gegenwärtigen Stand der neuen Methoden zur Sterilisierung von Trinkwasser. (Journal f. Gasbel. u. Wasservers. Jg. 56. 1913. p. 781—788. p. 813—816, 3 Tab.)

Hoover, Charles P., and **Scott, B. D.,** Sterilization of water mains polluted by sewage. (Engineering Rec. Vol. 67. 1913. No. 15. p. 394—395.)

Kienle, John A., Chlorine gas for water sterilization at Wilmington. (Eugineering Rec. Vol. 67. 1913. No. 15. p. 417, 1 Fig.)

Olsen, J. C., Luft- und Wasserreinigung durch Ozon. (Gesundheits-Ingenieur. Jg. 37. 1914. No. 13. p. 237—239.)

Thresh, J. C., Modern methods of water purification. (Surveyor. Vol. 43. 1913. p. 325.)

Nahrungsmittel im allgemeinen.

Henneberg, Wie ist bei der Einsäuerung der Kartoffeln zu verfahren und welche Einrichtungen sind dazu nötig? Mikrobiologische Grundsätze. (Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1914. No. 10. p. 141.)

Burri, R. u. **Kürsteiner, J.,** Studien über die zweckmäßigste Käsereilabbereitung. (Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1913. H. 8. p. 409—431.)

Wolff, A., Was ist Yoghurt und Intestibakter und worin besteht deren Wirkung? (Deutsche Vierteljahresschr. f. Gesundheitspfl. Bd. 45. 1913. H. 4. p. 673—676.)

Wein, Weinbereitung.

Baragiola, W. J. u. Godet, Ch., Die Vergärung des Traubenmostes unter Paraffinöl. (Zeitschrift f. Gärungsphysiol. Bd. 4. 1914. H. 2. p. 81—89.)

Lintner, C. J. u. Lüers, H., Über die Reduktion des Chloralhydrats durch Hefe bei der alkoholischen Gärung. (Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 88. 1913. H. 2. p. 122—123.)

Murdfield, R., Über ein Verfahren zur künstlichen Alterung von Wein. (Zeitschr. f. d. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußmittel Bd. 27. 1914. H. 1/3. p. 236—243.)

Neufeld, C. A., Die Schwefelsäure in deutschen und ausländischen Weinen, ihre Herkunft und Beurteilung. (Zeitschr. f. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. 27. 1914. H. 4. p. 299—311.)

Omeis, Th., Über den biologischen Säureabbau im Weine. (Zeitschr. f. d. Untersuchung d. Nahr.- u. Genußmittel. Bd. 27. 1914. H. 1/3. p. 226—235.)

Fleisch.

Müller, Reiner, Fischfleischvergiftung durch Bakterien der Paratyphus-Enteritisgruppe (Münchener med. Wochenschr. Jg. 61. 1914. No. 9. p. 471—473, 7 Fig.)

Wohnungen, Abfallstoffe, Desinfektion usw.

Koschmieder, H., Filtration und Sterilisation des Badewassers in den Schwimmbädern. (Städte-Ztg. Jg. 10. 1913. p. 546.)

Thumm, K., Abwasserbeseitigung bei Gartenstädten, bei ländlichen und bei städtischen Siedelungen. Berlin, Hirschwald, 1913. 36 p. 8°. 2 Fig. 1,50 ℳ.

West, D. F., The nemergency use of hypochlorite water disinfection at Philadelphia. (Eugin. News. Vol. 69. 1913. p. 264.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.

Krankheitserregende Bakterien und Parasiten.

Börner, Carl, Über reblausanfällige und -immune Reben. (Biol. Centralbl. Bd. 34. 1914. No. 1. p. 1—8.)

Chaine, J., La Cécidomyie du bius (Monarthropalpus Buxi Lab.). Morphologie, biologie, dégats, traitement. (Ann. des sc. nat. Zool. Année 87. 1913. Sér. 9. T. 17. No. 5/6. p. 257—359, 3 Taf. u. 26 Fig.)

Chittenden, F. J., On beans damaged by beetles. (Journal R. hort. soc. London. Vol. 39. 1913. P. 2. p. 379—380.)

Collinge, Walter E., Some observations on a peculiar soil disease. (Journal board of agric. London. Vol. 20. 1914. No. 10. p. 875—879.)

Cros, A., La mouche de l'olivier. (Bull. agric. de l'Algérie et de la Tunisie. Vol. 19. 1913. No. 22. p. 467—468.)

Dudgeon, G. C., A proposed method of controlling the ravages of leaf-eating caterpillars. (Bull. entomol. research. Vol. 4. 1913. Pt. 3. p. 243—245.)

Fletcher, T. B., Insects attacking the paddy plant i. S. J. (10 pp. et 2 pl. et 8 fig.). Madras 1913. (Dep. of agric. Madras. Vol. 3. Bull. 67.)

Franca, Carlos, La flagellose des Euphorbes. (Arch. f. Protistenk. Bd. 34. 1914. H. 1. p. 108—132, 1 Taf. u. 4 Fig.)

French, C., Insect pests of the potato. (Journal of agric. of Victoria. Vol. 11. 1913. P. 12. p. 729—748, 12 Taf.)

Fuller, Claude, Root-knot, gallworms, and eelworms. (Agric. Journal Union South Africa. Vol. 6. 1913. No. 5. p. 792—802, 6 Fig.)

Fulmek, L., Ein neuer Getreideschädling. (Wiener landw. Ztg. 1914. No. 20. p. 180, m. 6 Abb.)

Herrmann, Die Weiden-Schaumzikade, ein gefährlicher Feind der Weidenkulturen. (Der Lehrmeister im Gartenbau. 1914. No. 9. p. 100, m. Abb.)

Hollrung, M., Gedanken über einige neuzeitliche Erkrankungen an tropischen Nutzgewächsen. (Der Tropenpflanzer 1914. No. 3. p. 136—151.)

King, H. H., On the use of poison in the control of locusts in the Anglo-Egyptian Sudan. (Cairo scientif. Journal. Vol. 7. 1913. No. 86. p. 251—254.)

Krankheiten und Beschädigungen der Kulturpflanzen im Jahre 1911. Zusammengestellt in d. Kaiserl. Bot. Anst. f. Land- u. Forstw. (VIII, 339 p.) Lex. 8. Perlin, Barey, 1914. (Ber. über Landw., herausgegeb. v. Reichsamt d. Innern. H. 30.)

Magnus, Werner, Die Entstehung der Pflanzengallen, verursacht durch Hymenopteren. Jena, Fischer, 1914. VII, 160 p. 8⁰. 4 Taf. u. 32 Fig. 9 ℳ.

Massee, G., A disease of Narcissus bulbs. (Journal board of agric. Vol. 20. 1914. No. 12. p. 1091—1093.)

Matheny, W. A., A comparison of the American brown-rot fungus with Sclerotinia fructigena and S. cinerea of Europe. (Botan. Gazette. Vol. 56. 1913. No. 5. p. 418—432, 6 Fig.)

Misra, C. S., The red spider on jute (Tetranychus bioculatus Wood-Mason). (Agric. Journal of India. Vol. 8. 1913. P. 4. p. 309—316, 1 Taf.)

Moore, W., The wheat louse (Toxoptera graminum). (Agric. Journal Union South Africa. Vol. 6. 1913. No. 5. p. 767—772; No. 6. p. 972—977.)

Müller, H. C. u. Molz, E., Über den Steinbrand des Weizens. (Fühlings landw. Ztg. 1914. H. 6. p. 204—214.)

Münch, Über Hexenringe. (Naturwiss. Zeitschr. f. Forst- u. Landw. 1914. H. 3. p. 133—138, m. 2 Abb.)

Peacock, A. D., Entomological pests and problems of Southern Nigeria. (Bull. entomol. research. Vol. 4. 1913. P. 3. p. 191—220, 6 Taf.)

Pierce, W. D., The occurrence of a cotton boll weevil in Arizona. (Journal agric. Research. Vol. 1. 1913. No. 2. p. 89—96, 1 Taf. u. 9 Fig.)

Salmon, E. S., American gooseberry mildew: spraying experiments against Sphaerotheca mors-uvae: together with some observations on the life-history of this mildew. (Journal board of agric. Vol. 20. 1914. No. 12. p. 1057—1079, 1 Taf.)

Slawkowsky, Wilhelm, Die Hopfenblattlaus und ihre Bekämpfung. (Wochenschr. f. Brauerei. Jg. 31. 1914. No. 9. p. 89; No. 10. p. 101—103.)

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien und Parasiten.

Pflanzenschutz.

Cimatti, V., Per la difesa dei nostri agrumi. (Riv. di agricolt. Parma. T. 19. 1913. No. 49. p. 782—784.)

Gough, L. H., The fumigation campaign of 1912—1913. (Agric. Journal of Egypt. Cairo. Vol. 3. 1913. P. 1. p. 38—41.)

Heikertinger, Franz, Über die beschränkte Wirksamkeit der natürlichen Schutzmittel der Pflanzen gegen Tierfraß. Eine Kritik. (Biol. Centralbl. Bd. 34. 1914. No. 2. p. 81—108.)

—, Gibt es natürliche Schutzmittel der Rinden unserer Holzgewächse gegen Tierfraß? Ein Beitrag zur Frage des „Kampfes ums Dasein“ zwischen Pflanze und Tier. (Naturw. Zeitschr. f. Forst- u. Landw. 1914. H. 3. p. 97—113.)

Herrmann, Erfolgreiche Bekämpfung schädlicher Insekten mit Arsensalzen. (Deutsche Obstbau-Ztg. 1914. No. 5. p. 98—100.)

Kersken, Hans, Die Bekämpfung und Vernichtung der Unkräuter. (Hessische landw. Zeitschr. 1914. No. 11. p. 210—212; No. 12. p. 233—235.)

Labergerie, La lutte contre la grêle. (Rev. de viticult. Année 1. 1914. No. 1058. p. 355—356.)

Meißner, Versuche über die Bekämpfung des Heu- und Sauerwurms in Württemberg mit Nikotinbrühen im Jahre 1913 [Schluß]. (Der Weinbau. Jg. 13. 1914. No. 3. p. 35—45.)

Müller, H. C. u. Molz, E., Versuche zur Bekämpfung der durch Pleospora trichostoma hervorgerufenen Streifenkrankheit der Gerste. (Deutsche landw. Presse. 1914. No. 17. p. 205—206, m. Abb.)

Stand der Reblausbekämpfung im Jahre 1912 in den Kantonen Zürich und Thurgau. (Schweizer Zeitschr. f. Obst- u. Weinbau. 1913. No. 22. p. 349—350.)

Tubeuf, C. v., Bekämpfung der Ribes bewohnenden Generation des Weymouthskiefernblasenrostes. (Naturwiss. Zeitschr. f. Forst- u. Landw. 1914. H. 3. p. 137—139.)

Wislicenus, H. u. Neger, F. W., Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung der Abgassäuren auf die Pflanze. (Mitt. d. Kgl. Sächs. Forstl. Vers. Stat. Tharandt. I. H. 3 [p. 85—233, m. 29 Abb. u. 4 farb. Taf.]. 8⁰. Berlin, Parry, 1914.) 5,— ℳ.

Woodhouse, E. J., and **Dutt, H. L.,** Further work against surface caterpillars at Mokameh in 1912. (Agric. Gaz. of India. Vol. 8. 1913. P. 4. p. 372—389, 3 Taf.)

Zweigelt, Fritz, Zur Maikäferbekämpfung 1914. (Allg. Wein-Ztg. Jg. 31. 1914. No. 10. p. 75—77.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Inhalt.

Referate.

Andrewes, F. W., The cytology and bacteriology of condensed milks, p. 266.
Bail, O. u. Breinl, F., Versuche über das seitliche Vordringen von Verunreinigungen im Boden, p. 278.
Beckwith, T. D., Soil Inoculation under Soil Conditions of Lime Deficiency, p. 284.
Beijerinck, M. W., Over de samestelling der tryosinase uit twee enzymen, p. 248.
Belonovsky, G. D., Sur la prolongation de la vitalité du Bacille bulgare, p. 270.
Bleicken, Die Bedeutung der deutschen Weichkäserei, p. 273.
Böeseken, J. u. Waterman, H. J., Eene biochemische bereidingswijze van l-Wijnsteenzuur, p. 297.
Bokorny, Fr., Bindungsvermögen lebender Hefe für Ammoniak, geringe Beteiligung wasserlöslicher Säuren, p. 252.
Bornemann, In welchem Maße tragen Stallmist und Gründüngung durch Lieferung von Kohlensäure zum Ernteertrag bei? p. 290.
Brown, Charles W., Action of a few Common Butter Organisms upon Casein, p. 272.
Burri, R., Über die Beziehungen gewisser Schimmelpilze des Bodens zu den benzoësauren Salzen und anderen aromatischen Körpern der Gülle, p. 295.
— und **Kürsteiner, J.,** Studien über die zweckmäßigste Käsereilabbereitung, I. Teil: Der Einfluß des Kasols auf den Säuregrad des Labes, p. 273.
Bussmann, Erich, Einige Versuche über den Einfluß von Phonolith und Kalktraß auf das Stickstoffsammlungsvermögen von Ackererden, p. 291.
Cayla, V., Les taches du Caoutchouc de plantation, p. 297.
De Smet, La composition de la bière et sa stabilité, p. 256.
Detre, L., Die Milch als Trägerin von Infektionen, p. 268.
Doane, C. F., The Action of Bacillus bulgaricus in Suppressing gassy Fermentations in Cheese making, p. 272.
Drews, R., Die Milchversorgung großer Städte mit spezieller Berücksichtigung der Verhältnisse in Hamburg, p. 264.
Edwards, S. F., Notes on Yeast-like Organisms in Whey, p. 272.
Ehrenberg, Paul, Zur Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau, p. 279.
Ehrlich, Felix, Neuere Untersuchungen über die Vorgänge beim Eiweißstoffe der Hefe- und Schimmelpilze, p. 251.
—, Über einige chemische Reaktionen der Mikroorganismen und ihre Bedeutung für chemische und biologische Probleme, p. 245.
Ernst, A. u. Bernard, Ch., Beiträge zur Kenntnis der Saprophyten Javas, p. 300.
— u. **Schmid, E.,** Über Blüte und Frucht von Rafflesia, p. 300.
Fettick, Otto, Butter mit Stallgeruch und bitterem Geschmack, p. 275.
—, Schleimige Milch, durch den Bac. mesentericus fuscus hervorgerufen, p. 263.
Fischer, H., Die Bakterienimpfung zu Leguminosen, p. 286.
Friedel, K., Besteht ein Zusammenhang zwischen Sammelmolkereien und einer angeblichen Unterernährung und der Säuglingssterblichkeit auf dem Lande? p. 267.
Gabathuler, A., Ein Beitrag für Yoghurtkontrolle, p. 270.
Grafe, V. u. Vouk, V., Das Verhalten einiger Saccharomyceten (Hefen) zu Inulin, p. 252.
Grignan, L'inoculation de bactéries nitrifiantes dans le sol, p. 286.
Grimmer, Beiträge zur Kenntnis der Fermente der Milchdrüse und der Milch, p. 246.
Harding, H. A., Ruehle, O. L., Wilson, J. K. and **Smith, O. A.,** The effect of certain dairy operations upon the germ content of milk, p. 263.
Harnoth, Über den Stand der Gründüngungsfrage in Mittel-, West- und Süddeutschland, p. 289.
Hayata, B., Über die systematische Stellung von Mitrastemon, als einer neuen Gattung und besonderen Tribus der Rafflesiaceen, p. 301.
Heinze, B., Einige weitere Beiträge zur Kultur der Leguminosen mit besonderer Berücksichtigung der Stickstoffernährung, p. 285.
Henneberg, W. u. Bode, O., Die Gärungsgewerbe und ihre naturwissenschaftlichen Grundlagen, p. 250.
Herzfeld, Welche Erfahrungen liegen für die Einmietung der Schnitzel unter Impfung mit Lacto-Pülpe vor? p. 298.
Hewlett, R. T., Villar, S. u. Revis, C., On the Nature of the cellular Elements present in Milk, p. 263.
Huyge, C., Index bibliographique des travaux parus sur le lait et les produits laitiers pendant l'année 1912, p. 262.
Jancsó, Béla, Chlornatrium als Düngemittel für Zuckerrüben, p. 290.
Jones, Dan H., A cultural and morphological Study of some Azotobacter, p. 278.
Käse, Einseitig geblähter, p. 274.
Kappen, H., Die katalytische Kraft des Ackerbodens, p. 282.
—, Die Katalyse des Cyanamids und ihre Bedeutung für die Landwirtschaft, p. 283.
Kaserer, H., Versuche über Bodenmüdigkeit, p. 276.

Kellerman, Karl F. and **Fawcett, Edna H.**, Studies of the B. subtilis Group, p. 300.
van Ketel, B. A., Bacillus coli in der Milch, p. 269.
Kita, G., Japanische Sojaindustrie, p. 257.
Kleinböhl, H., Gervaiskäse, p. 273.
Kluyver, A. J., Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen, p. 252.
Koch, Alfred, Ergebnisse zehnjähriger vergleichender Feldversuche über die Wirkung von Brache, Stalldünger und Klee, p. 291.
Kostytschew, S., Brillant, W. u. **Scheloumoff**, Über die Atmung lebender und getöteter Weizenkeime, p. 248.
— u. **Scheloumoff, A.**, Über Alkoholbildung durch Weizenkeime, p. 253.
Krainsky, A., Zur Frage der Zellulosezersetzung durch Mikroorganismen, p. 296.
Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie, p. 242.
Lang, Le Roy, A method for the improvement of buttermilk from pasteurized cream, p. 275.
Laxa, O., Über die Bedeutung der Wiesen und Weiden für die Milchwirtschaft, p. 268.
Lemmermann u. **Fresenius**, Beitrag zur Frage der Ammoniakverdunstung aus Böden, p. 280.
Liechti, Paul, Über die Wirkung des Schwefels auf das Pflanzenwachstum, p. 295.
Löhnis, F., Untersuchungen über den Keimgehalt der in Leipzig im Handel befindlichen Milchsorten, p. 261.
—, Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie, p. 241.
Lundberg, J., Einwirkung des Cyklamins auf die alkoholische Gärung, p. 253.
Lvoff, S., Hefegärung und Wasserstoff, p. 254.
Matruchot, L. et **Desroche, P.**, Sur la végétation sulfureuse de la Pièce d'eau des Suisses à Versailles, p. 258.
Mazé, P., L'Affinage des fromages moisis et les ferments qui y président, p. 274.
McDermott, F. A., On some chemical activities of Citromyces: Utilization of nitrogenous substances, and effects of heavy metals in the medium, p. 297.
Meißner, R., Über die Bildung flüchtiger Säure in zuckerfreien Weinen und Nährlösungen bei Luftzutritt durch reingezüchtete Weinhefen, p. 255.
Mielck, Otfried, Die Wirkungen der Gründüngung, p. 286.
Milch euterkranker Kühe, p. 268.
Muth, Fr., Über den Einfluß des Frostes auf die Zusammensetzung des Mostes und Weines der Trauben, p. 255.
Palladin, W. u. **Lvoff, S.**, Über die Einwirkung der Atmungschromogene auf die alkoholische Gärung, p. 249.
Paris, G., Contributo sperimentale allo studio dei Saccaromiceti, p. 250.
Perotti, R., Sopra la microflora della Campagna romana, p. 275.
Petit, P., La question de l'eau, p. 256.
Pringsheim, Hans, Die Beziehung der Zellulosezersetzung zum Stickstoffhaushalt in der Natur, p. 295.
Rahn, Otto, Bacterial Activity in Soil as a Function on the various physical Soil Properties, p. 276.
Ramm, Zur Frage der Impfung bei Neukulturen auf Hochmoor, p. 285.
Rasquin, M., Le lait et les microbes, p. 264.
—, Les fraudes du lait, p. 268.
Rubner, Über Hefeforschung, p. 250.
Scales, F. M., McBeth, I. G. and **Smith, N. R.**, Characteristics of cellulose-destroying Bacteria, p. 296.
Schepotieff, A., Untersuchungen über niedere Organismen, p. 258.
Schliephacke, Einsäuern und Futterwert von Rohkartoffeln und Stoppelklee, p. 298.
Schulz, Konrad, Die Verbreitung der Bakterien im Waldboden, p. 277.
Schwarz, Yoghurt, p. 270.
v. Seelhorst, Die Wasserbilanz und die Nährstoffverluste eines gebrachten Lehm- und Sandbodens in den Jahren 1905—1912, p. 293.
—, unter Mitwirkung von **Müther, Mayer, Bothe, Haas, Ohlmer**, Graf **Rostworowski** und **Sinz**, Der Verbleib des Gründüngungsstickstoffs im Sandboden auf Grund von Vegetationsversuchen, p. 287.
Smit, Jan, Bakteriologische und chemische Untersuchungen über die Milchsäuregärung, p. 259. [Holländisch.]
Staub, W., Weitere Untersuchungen über die im fermentierenden Tee sich vorfindenden Mikroorganismen, p. 298.
Steinegger, R., Förderung der Lochbildung im Emmentalerkäse, p. 275.
Stowell, E. C., Hillard, C. M. and **Schlesinger, M. J.**, A biometric Study of Streptococci from Milk and from the human Throat, p. 264.
Sullivan, M. X., The Origin of certain organic Soil Constituents, p. 276.
Tacke, Br. u. **Brüne, Fr.**, Vergleichende Düngungsversuche mit Kalkstickstoff, Stickstoffkalk, Chilesalpeter u. schwefelsaurem Ammoniak auf Sand- und Hochmoorböden, p. 294.
Takahashi u. **Yukawa**, Die Pilze von „Shoju Moromi", p. 257.
Tymstra, B. S., Tabaksfermentatie, p. 297.
Vogel, J., Bemerkung zu meinen Beobachtungen über das Verhalten von Nitrat im Ackerboden, p. 281.
Wachtel, Paul, Die Wasserstoffsuperoxydkatalyse durch Boden, p. 284.

Wagener, W., Zur Frage der Ernährung kranker Säuglinge mit Larosanmilch, p. 269.
Wiegner, Georg, Die Festlegung des Stickstoffs durch sogenannte Zeolithe, p. 281.
Wolff, A., Blaue Milch, p. 267.
—, Was ist Yoghurt und Intestibakter und worin besteht deren Wirkung, p. 271.
Wolodarski, G., Untersuchungen über die feinsten Luftstäubchen, p. 299.
Zaleski, W., Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenatmung, p. 248.
—, Bemerkungen zu Kostytschews Mitteilungen über die Atmung der Weizenkeime, p. 250.
—, Über die Verbreitung der Karboxylase in den Pflanzen, p. 247.
Ziegenmilch als Kinder- und Krankenmilch, p. 267.
Zikes, Heinrich, Ein Beitrag zur Enzymbildung und deren Ursachen, p. 246.
—, Einige orientierende Versuche über die Thermogenität verschiedener Hefen in Glukosewürze, p. 251.

Untersuchungsmethoden, Instrumente etc.

Auzinger, A., Die Alkoholreaktion der Milch, p. 308.
Beijerinck, M. W., Over het indringen van methyleenblauw in levende cellen na indroging, p. 302.
Brown, P., E. A new Method for the bacteriological Examination of Soils, p. 312.
Ficker, M., Zur bakteriologischen Wasseruntersuchung, p. 303.
Fred, Edwin Brown, The Use of Stains in the Study of Bacteria, p. 302.
Freund, W., Das Biorisatorverfahren nach Dr. Lobeck, p. 305.
Grimmer, Über den Wert der biologischen Milchuntersuchungsmethoden, p. 307.
Kern, H. u. **Müller, E.**, Über eine vereinfachte Herstellung der Eiweißmilch, p. 306.
Larsen, C., **White, Wm.** and **Fuller, J. W.**, Preliminary report on the milking machine, p. 308.
Legendre, R., Simple tour de main pour obtenir une chambre humide microscopique, p. 302.
Löhnis, F., Die Titration der Milch mit Alkohol von verschiedener Konzentration, p. 309.
Marcas, L., Moyens rapides de contrôle de la pureté de la fermentation lactique, p. 304.
Molisch, H., Mikrochemie der Pflanze, p. 301.
Morres, W., Warum ist die Alizarolprobe wertvoller als die Alkoholprobe? p. 310.
Perfiliev, B., Ein Schlammsauger zur Gewinnung der Bodenmikroflora und -fauna, p. 312.
Skar, Olaf, Verhalten der Leukocyten der Milch bei der Methylenblaureduktaseprobe, p. 305.
Smirnow, M. R., The Value of glycerinated Potato as a Culture Medium, p. 303.
Stuchlik, Jar., Serologie in der Botanik, p. 302.
Tillmans, J., **Splittgerber, A.** u. **Riffart, H.**, Über Bestimmung und Bedeutung des Ammoniakgehaltes der Milch, p. 311.

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien etc.

Aumann u. **Storp**, Über die Sterilisation kleiner Trinkwassermengen durch Chlorkalk, mit Berücksichtigung der militärischen Verhältnisse, p. 313.

Neue Literatur, p. 314.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 27. Mai 1914.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. No. 11|17.

Ausgegeben am 30. Juni 1914.

Nachdruck verboten.

A bacterial Disease of the Larvae of the June Beetle, Lachnosterna spp.[1]

By **Zae Northrup,**

Laboratory of Bacteriology and Hygiene, Michigan Agricultural College, East Lansing, Michigan, U. S. A.

With 5 Textfigures and 4 Plates.

The „white grub“ or larva of the May or June beetle, Lachnosterna spp., was brought forcibly to the notice of the farmers during the summer of 1912 on account of the serious depredations to various crops. This is by no means the first year that the ravages of these insect larvae have been recorded. Their activities were known as early as the middle of the seventeenth century (1) and have continued to be remarked with more or less regularity every few years up to the present time. In the American Naturalist of 1867 and 1868, note of their activities is found (2), (3); Chas. V. Riley (4), State Entomologist of Missouri, in his annual reports beginning with the year 1874 makes mention every year or so of the serious injury to crops by the white grub.

The most extensive observations and investigations with regard to the white grub in its economic and other aspects, however, have been carried on by Dr. S. A. Forbes, State Entomologist of Illinois. In his several bulletins (5—8) studies of the life cycle, habits and remedial measures both natural and artificial, are treated in detail. Extensive work is being carried on at the present time under his direction toward the determination of the exact duration of the life cycle of this pest and toward its annihilation by means of parasitic enemies.

The larvae of the June beetle feed upon the roots of vegetation, cutting them off two inches or more below the surface of the soil. They are found in the soil under sod, among grass roots, in corn fields, strawberry plats, asparagus beds, grapevine roots, frequently kill young evergreen nursery stock and are fatal to the violet, rose and other ornamental plants grown in the greenhouse (9), (10), (11). Reports came in this season (1912) of fields of potatoes, beans and beets also being infested. In the 1912 report of the State Entomologist of Connecticut (12), remark is made of the excessive injury done the past season to lawns and to miscellaneous crops in Connecticut, New York and New Jersey.

These insect larvae, known locally as „caculo“ or „gusano blanco“ are also a serious pest to the sugar cane in Porto Rico (13).

These larvae have a life cycle of at least three years, but rarely do noticeable damage during the first year of their existence because of their relatively small size; the second and third years however, are often marked by serious ravages to crops and to grass land.

Up to the present time, in the United States no artifical remedies have been in any way successful in controlling the numbers and proportionate depredations of these grubs, nor have the natural means of suppression been sufficiently potent. Hogs and fowls allowed to run on newly plowed land eat the grubs, but this or similar remedial measures can be used evidently only under restricted conditions. Two species of blackbird in Porto Rico are very active in following the plow, searching for and eating the white grubs (13).

---

[1] Submitted in partial ful filiment of the requirements for the degree of Master of Arts in the University of Michigan.

A remedy which would fill the real need is one which would act in situ. Such provision for holding the white grub in check is found in the insect parasites and parasitic fungi. Up to the present time at least nine other insects, three species of fungi and two species of bacteria (14) are known to attack the larvae of Lachnosterna spp. and related genera. This article describes a third bacterial infection due to a micrococcus, the characteristic lesions of which were apparently described by Krassilstschik but were attributed to a „decomposition of the epidermis provoked by a rupture of the cuticle whose elasticity is somewhat limited“ (translation).

Mr. Xavier Raspail in his article in the „Mémoires de la Société Zoologique de France“ says 'efficacious animal parasites of this insect are unknown' (13).

Some twelve years ago, cultures of a parasitic fungus, (Botrytis tenella) Isaria densa were for sale in France as a remedial measure against the larvae of the European May beetle, Melolontha vulgaris. The results were very variable, which was believed however, not to be due to failures but to faulty applications and frauds committed at the time the culture tubes were put on the market. Mr. le Moult (in Nevers) who was the very first one to study the subject in France from the standpoint of the utilization of the fungus on a large scale, is of the opinion that the method is very effective. The industry of preparing the pure cultures of Isaria densa was founded in 1891 in Paris; faulty preparation of the cultures however, markedly lessened the usefulness of the material and when the fraud was pointed out, the industry ceased to exist.

Mr. le Moult stated however that the results of inoculation of the soils of the Canton of Gorrow in 1891 and 1892 exceeded all hopes; the ruin caused by the white grubs was followed by affluence and the parasites used in the soil still continued their destructive action on the grubs produced by beetles from neighboring cantons (13).

In Mr. C. E. Hood's report (up to December, 1911) as traveling entomologist for the Porto Rico Board of Agriculture, concerning parasites of the white grub, he states that a certain fly parasite, Pyrgota undata, judging from what work has been done on it, is the only Lachnosterna parasite that can be increased artificially.

Most literature upon the white grub, the larva of Lachnosterna spp. consists only of the incidence of the grub, a description of the larva and beetle as to appearance, habits of feeding, locomotion, etc., and the above mentioned remedial measures.

Pettit (15), in his bulletin on „Insects of the Garden“ is among the few to mention the fact that these larvae are subject to diseases; to quote: „these larvae are especially apt to be killed off by diseases and natural enemies so that they come and go with no apparent reason for so doing. They seldom remain very numerous in one field for more than one or two years, because of these enemies and diseases[1].“

---

[1] Pettit now (1914) states that the three year cycle may account in part, for the regular appearance and disappearance of these larvae.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

During the summer of 1912, many complaints came to the Entomological Division of this Station of the ravages of the white grub and accompanying the letters in many cases were specimens of the pest. Prof. Pettit noted that the largest percentage of the specimens was diseased to a greater or lesser extent. From the previous history of similar infections he had remarked that when the larvae became infected, the course of the disease was so rapid and the consequent destruction of the larvae so thorough that healthy specimens were difficult to obtain, even early in the season and but few would be found for the next few years; with this in mind, the specimens of the grub and addresses of the farmers sending the same were immediately turned over to the Bacteriological Laboratory with the hope that the cause of the disease might be ascertained and if practicable, used as a remedial measure.

Part I.

Experiments with Larvae of Lachnosterna spp.

The normal larva is described (15) as a grub, white and soft with the exception of the head and six legs, having a row of spiracles (breathing pores) along the sides, a delicate watery creature with awkward gait and feeble powers of locomotion.

The diseased larva differs from the normal larva in that the affected parts are very black and shiny and are sharply circumscribd. The infection occurs mainly along the joints of the legs, spiracles and upon the dorsal or ventral segments of the white soft portion.

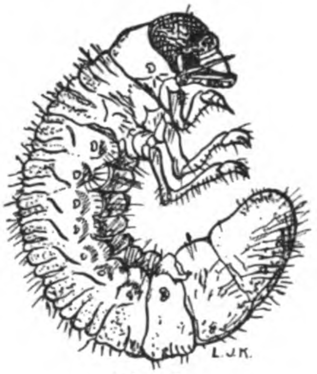


Fig. 1.

Badly diseased larvae are almost entirely black or brownish-black in color; the whole body often seems to be in a state of advanced putrefaction, yet the larva still shows signs of life[1]).

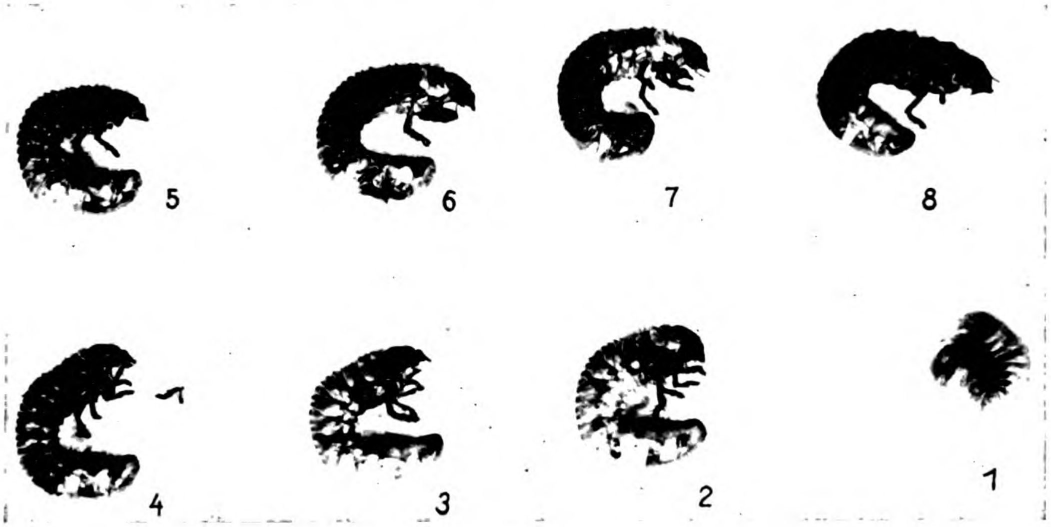


Fig. 2.

---

[1]) It is now thought that this brownish coloration of the diseased larvae is most probably due to the invasion, secondary or primary, of another organism, the gas bacillus

It would not be remarkable if the rapid generalization[1]) of this disease occurred after the first infection, because of the nature of the circulatory system, there being no system of closed blood vessels, only a heart and short artery located along the median dorsal line, the blood wandering freely through the body cavity bathing all the tissues (16).

The progressive destructiveness of the disease is most marked in the affections of the legs. In some cases the infection begins at the tip of the leg and as it progresses, the leg, segment by segment, blackens and drops off leaving the stumps shiny, black and sometimes swollen in appearance; in other cases the infection occurs at one of the intermediate joints or at the last joint nearest the body of the grub, the leg in time loosening and breaking off at the point of infection. This phenomenon was apparently noted by Krassilstschik as follows: „larvae with one or several more or less affected legs are found, the parts of which near the body become entirely black" (translation) (see Fig. 2). Within certain limits neither the size nor the number of infected areas seems to affect the activity of the grub. To quote Krassilstschik again „This (referring to the black spots) does not hinder the larvae from being in the best state of health, from being transformed into a chrysalid, etc." (translation). Only under certain conditions which will be mentioned later is the activity of the grub lessened, and followed later by death. Most of the grubs examined were very active unless badly infected with the disease.

Etiology of the Disease of the June Beetle Larvae.

Smears were made from a dead grub badly infected with the disease, and stained with carbol-fuchsin. Micrococci predominated; there were present also a number of bacteria with rounded ends, in chains.

Smears were also made from the diseased portion of a living grub, an incision being made in the diseased tissue with sterile scissors, the material being obtained with a sterile platinum loop. These preparations were stained with carbol-fuchsin and with Wright's stain and examined with the $^1/_{12}$ oil immersion lens. Only an occasional preparation contained organisms; these appeared to be cocci, not perfectly round; occurring as diplococci and tetrads.

Transfers of the infectious material from this incised portion of the larva were made to tubes of sterile broth and slant agar. Plates were made from one of the broth tubes, in ordinary agar.

The 24 hour cultures in broth were uniformly cloudy, no ring or pellicle, and a few bubbles of gas were noted; on agar the growth was white, moist, beaded, semi-translucent, not spreading. The plates made from the broth tube inoculated directly from the diseased portion of the living grub gave almost a pure culture of micrococci; this seemed to indicate that this micrococcus was the causal organism. (Pébrine, an infectious disease of silk worms was formerly supposed to be due to a micrococcus, Micrococcus ovatus, but is now known to be due to a protozoan [17]).

---

found in the diseased larvae which appears to be similar to Krassilstschik's bacillus of septicemia B. septicus insectorum (see p. 330).

[1]) This "generalization" of the disease is now thought to be a manifestation of the septicemia-like character of the agent which causes the brownish coloration of the larvae.

Morphological and Cultural Characteristics of the Micrococcus.

The following observations were made on pure cultures of the micrococcus isolated from the agar plates mentioned above. The cultures were grown at 20°—25° C.

Morphology: Micrococci of varying sizes, 0.9 microns, 1.2 to 1.4 microns diameter with dividing forms; occur singly, in twos (diplococci), threes (triangular), fours (tetrads or diamond shape), and clumps of more or less regular grouping, the individuals in the groups arranged in a honeycomb-like order (see Plate I, Figs. 1 and 2); chains of more than three never observed.

Division in one plane very evident; (see Plate I, Fig. 1); division in two planes in a single organism was infrequently observed.

Ordinary agar, stroke culture: 7 days, growth abundant, beaded, flat, glistening, slightly contoured, opaque, pale orange-yellow, butyrous consistency, no odor. (See Plate I, Fig. 3.)

Cultures newly isolated are non-pigmented and show very moderate growth; successive subcultures however have a dull yellow-orange color which darkens somewhat with age; the latter show abundant growth.

Dextrose agar, stroke culture: 48 hours, growth moderate, limited to line of inoculation, rather membranous; other characters the same as on ordinary agar.

Broth: 48 hours, turbid, no ring or pellicle, no gas.

Larva broth: Same as ordinary broth.

Litmus milk: 7 days, slightly acid, slight reduction, no coagulation, yellowish deposit of bacterial cells at bottom of tube. (Some cultures showed coagulation).

Gelatin stab: Within 24 hours, liquefaction crateriform, 2nd day becoming stratiform; liquefaction proceeds but slowly.

Another gelatin stab culture after 7 days growth showed only crateriform liquefaction, growth best on surface, line of puncture filiform to beaded at greatest depth. One culture showed viscidity.

Larva-gelatin stab: Best growth at surface at first, crateriform liquefaction becoming napiform to saccate. Heavy deposit of bacterial sediment at base of liquefied sac. (See Plate I, Fig. 4.)

Dextrose, lactose and saccharose fermentation tubes; 48 hours, turbidity in open arm only, no gas.

Maltose peptone solution: 24 hours very turbid. Older culture shows sediment but no surface growth.

Indol production: positive but moderate.

For the purpose of checking the above results, this organism was given to one of the students as an „unknown". I am indebted to Mr. C. R. Garlock for the following data concerning the morphological and cultural characteristics of the micrococci predominant in the diseased portions of the white grub.

Name of microörganism: Unknown, designated as No. 25.

Isolated from: dextrose agar slant, pure culture.

Occurrence: not known.

Importance: not known.

Spore: none observed.

Method of reproduction: binary fission.

Total organism: drawings of diplococci and tetrads.

Arrangement: in twos and fours.

Size: 1.2 microns to 1.4 microns in diameter.

Flagella: none.

Involution forms: none.

Capsules or zoöglea: none.

Hanging drop: drawing shows that the organisms are attracted to the periphery of the drop, demonstrating positive aerotaxis.

Nutrient broth: no change the first day, turbidity and deposition of sediment takes place gradually until the 5th day, when a decided cloudiness and sediment is evident.

Nutrient gelatin stab: 2nd day beaded, no liquefaction noted.

Agar streak: 1st day filiform growth, seems to be made up of small colonies creamy white in color. Colony forms still evident on 2nd day, 4th day colonies have merged, brownish yellow in color. (See Plate I, Fig. 3.)

Potato culture: 6th day brownish yellow, restricted growth.

Gelatin plate: 2nd day, colonies 1 mm. to 2.5 mm. in diameter, flat, slightly elevated, smooth edge, interior homogeneously granular.

Agar plate: 11th day, colonies the size of a pin point to 1.5 mm. in diameter, elevation of growth a little more pronounced than on gelatin plate, smooth edge, dense center, rest of colony homogeneously granular.

Color production: As noted under agar and potato cultures.

Production of NH_3, H_2S and indol: gave no reaction with methods employed.

Litmus milk: no change for 10 days, 10th day partial reduction, 11th day acid, curd and more reduction, 14th day complete reduction with some separation of whey.

Reduction of nitrates: positive reaction.

Fermentation of carbohydrates: no gas production. Peptone water (blank), dextrose, lactose and saccharose give good growth with sedimentation, in open arm only. (Lactose seems the most favorable.) Starch and maltose are much more favorable to luxuriant growth.

These data agree very well with the preceding with the exception of a few particulars as the liquefaction of gelatin, action in litmus milk and indol formation.

Throughout all culture media, almost without exception, this organism shows the tendency to develop in small separate colonies. This is especially marked in whey, larva broth, on the surface of slant agar and in the gelatin cultures.

Staining Reactions in Culture.

The micrococcus stains best with aqueous-alcoholic dyes; is Gram-positive, but negative to the acid-fast stain and to Neisser's stain for metachromatic granules.

An attempt was made in seeking out the nomenclature of this organism but difficulties were met which prevent the fixing of the micrococcus in a definite group. It seems to enter the class with Micrococcus hemorrhagicus, with the exception of the size (18). From the characteristic shiny black lesions produced by this organism it has been named "Micrococcus nigrofaciens".

Pathogenicity of the Micrococcus.

Eight larvae were received from an infected field near Sebewaing, Michigan. One of these was apparently not diseased, three showed infected areas

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

not more than 0.5 mm. in diameter, the remaining four were in an advanced stage of the disease. All but one were very active and this one to all appearances was but slightly affected with the disease.

Soil having no previous history of white grubs was obtained from the garden adjoining the laboratory, placed in large petri dishes and one portion sterilized in the autoclave at 15 lbs. pressure for 3 hours, the other portion baked in the hot air oven at 180° C. for 30 minutes.

This latter portion after being sterilized was mixed as aseptically as possible with enough sterile water to make the soil of about the same plasticity as when obtained from the garden. A few drops of a broth culture of the Micrococcus were then added and mixed thoroughly using aseptic precautions as before. The apparently uninfected larva was washed with a camel's hair brush dipped into a 5 per cent solution of boric acid, washed off with sterile water and placed in this inoculated soil.

Six days afterward the larva was examined and found to be still apparently perfectly normal. The absence of infection was assumed to be due to the perfect impermeability of the integument. With the possibility in mind that natural infection results from bacterial invasion of accidental abrasions or wounds or inherent imperfections of the integumental membrane, an incision was made near one of the spiracles, thereby imitating as nearly as possible, supposed actual conditions; the grub was then replaced in the inoculated soil.

Two days later, the larva was again examined and was found to have a characteristic shiny black lesion at the point of incision. The larva was found dead the afternoon of the next day.

It was suggested by Dr. Shafer of the Entomological Department that this supposed lesion which was characteristically black, was perhaps only the blackening of the blood caused by oxidation upon exposure to the air. For determinating this point, other larvae were carefully incised and left exposed to the air for from one to five hours. No blackening of the incised portion occurred in any case. The incision was not evident except as the larva was handled roughly, when the clear colorless blood exuded. (This experiment was made with larvae of the Southern U. S. June beetle.)

The recovery of the micrococcus from the diseased portion of this larva followed of a certainty, but whether the organisms were really recovered from the infected part or came from faulty sterilization of the exterior portion of the integument or from those which entered the body by means of the digestive tract could not be determined very well.

In summarizing the above experiment (which was the only one of its kind performed at this time, due to the lack of healthy larvae) it seems that even this single trial may be taken as at least indicative of several things.

1. That the Micrococcus isolated from a diseased larva of the June beetle, Lachnosterna spp. is pathogenic to other larvae of the same species.
2. That this organism must exist in the soil.
3. That infection may occur from without.
4. That if (3) is possible, the diseased larvae must have become infected through some abrasion of the integument, some imperfection of the joints of the legs or abdomen or through the hair follicles. The following illutrations furnish a defense for this premise. (See Figs. 3 and 4; Plate I, Fig. 5; Plate III, Fig. 9; Plate IV, Fig. 10.)

At the same time that the healthy grub was placed in artificially infected soil, a second apparently healthy grub was placed in "naturally infected" soil. The latter was soil sent in containing badly diseased grubs. At the end of 5 days no infection was apparent so this larva was incised in order to repeat the foregoing experiment. Unfortunately the cut was made so deep as to cause the soft inner body parts to extrude and the larva soon died.

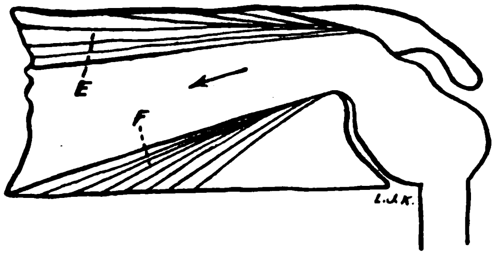


Fig. 3.

In the effort to repeat the first experiment the incisions all proved fatal. It is very difficult to make an incision in an active grub, even with very sharp pointed scissors on account of the chitinous nature of the integument and unfortunately anesthesia cannot be practised without fatal results. These several futile attempts resulted in the destruction of the few remaining healthy larvae and no others could be obtained.

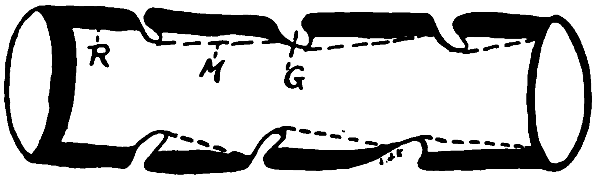


Fig. 4.

Demonstration of Bacteria in Diseased Tissues of Larvae of Lachnosterna spp.

Microtome sections of diseased portions of several larvae were stained with eosin and methylene blue for the purpose of detecting bacteria in the larval tissues.

Beautiful pictures were thus obtained of the cellular structure of the larvae. The micrococci were found, unstained, but dark brown in color, in masses in the laminae of the integument, and in the subnascent cells. The tissues surrounding the microörganisms were also of a dark brown color. (See Plate II, Fig. 6; Plate III, Figs. 8 and 9; Plate IV, Fig. 10.) Micrococci stained blue were found also, interspersed between the cells of the intestinal wall but were never demonstrated in the body tissues intervening. This seemed to suggest that the black diseased areas were produced by extraneous infection only, although the micrococci found between the cells of the intestinal wall were doubtless the same as those introduced artificially into the soil and those found in the diseased portions of the integument.

The micrococci found in the intestinal tract and walls may exert a similar and perhaps even a more powerful influence on the cell activities of the larva than those found in the integument because of the essential difference in the functions of the respective cells and in the nature of their structure.

Irregular shaped masses also staining blue were found interspersed between the cells of the intestinal wall both in the presence and in the absence of micrococci. The accompanying photomicrographs illustrate the above conditions.

Effect of the Moisture Content of the Soil upon Diseased Larvae.

While moistening one lot of baked sterilized soil with sterile water, unintentionally an excessive amount of water was added. This soil was inoculated with a broth culture of the micrococcus as before and a slightly infected larva placed in it. This larva died within two days.

Other similar experiments were then performed to ascertain whether the excess of water was pertinent with regard to the time factor of the disease, i. e., whether the amount of water present in the soil, within certain limits, was not in direct proportion to the duration of life of the grub after infection[1]).

The following experiments seem conclusive: A larva having the middle left leg infected up near the body was placed in soil obtained from the garden near the laboratory; this soil has been free from "white grubs" as far as could be determined. Within two days the leg dropped off at the point of infection but during 14 days no further progress of the disease was noted. At this time an excess of water was added to the soil. Two days later the larva was found dead. The infection had progressed up into the body to some extent and the body contents seemed in a liquid condition.

A second larva, having the 2 front left legs off at the second joints and no other visible infection was placed in soil from the garden, as above. After 16 days sojourn in this soil, the larva was examined and the third leg on the same side was found to be infected at the tip; no other marks of infection were noted, nor had the infection apparently progressed in the other legs. The soil, at the end of the 16 days, was then saturated with sterile water. Three days later, the larva was found dead, the last leg to be infected was found diseased where it joined the body. and the infection had extended into the body whose contents were seemingly in a liquid condition as in the case of the first larva.

This phenomenon suggests several possibilities: that this micrococcus is more virulent or finds more ready entrance into the body of the grub in the presence of excessive moisture, that the same may be true with regard to the gas-bacillus which is quite constantly associated with the micrococcus in diseased larvae, or that the progress of the disease is augmented by the mere physical presence of an abnormal amount of water in the soil.

These hypotheses seem to be confirmed by a survey of the natural conditions which obtained during the summer of 1912. The Michigan farmers will remember the above-mentioned season for its continuous rainfall. The official weather reports for this region do not show an especially marked increase in rainfall over that of other years but a glance at the data (19) shows the following conditions:

Although on but 14 days out of 31 in both July and August and 13 out of 30 in September, precipitation was recorded, in many cases this occurred several days in succession with cloudy days intervening, allowing of almost no evaporation on account of continual low temperatures, the mean for July being 69.6°, for August 65.7° and September 62.7° Fahr. This would produce a continuous, almost water-logged condition of some soils. A correlated theory is, that the evaporation at the surface of the soil, especially that due to growing plants, is an important and perhaps a predominant factor in prolonging cloudy and rainy periods. A lowering of temperature during these periods is due to the same causes (20).

---

[1]) Dr. Britton (12) says: "The dry season seems to favor the increase and abundance of white grubs. Several such droughts in succession generally precede or at least accompany severe white grub injury."

These conditions, seem to account partially at least, for the fact that the larvae which were sent in early in July showed but slight infection while those sent in the latter part of August and September were in a very badly diseased condition.

In comparison, infected larvae existing in ordinarily moist soil in the laboratory lived many days, in fact many weeks and months without a marked progress of the infection. A few slightly infected larvae lived a maximum of 6 months under laboratory conditions. Muscardine, pébrine and flacherie (all, caterpillar diseases) are similarly affected by wet weather (21). The death of the larvae subjected to excessive moisture may have been due, however, not to the micrococcus alone but to this organism supplemented by the gas-producing bacillus found also in the plates made from the infected portion of a larva (See p. 324). This organism is very vigorous in its activities, grows abundantly on all ordinary media but is favored by sugar media in which it produces acid and gas; it liquefies gelatin rapidly and grows equally well at 25° C. and 37° C. It is found to be the predominant organism in badly diseased or in dead larvae showing putrefaction. (This organism seems very similar to the bacillus of septicemia investigated by Krassilstschik, both culturally and in its apparent action on the larvae. The etiological relation of the gas-bacillus to the brown coloration of the diseased larvae has not yet been studied extensively.)

When a mixed culture of the micrococcus and bacillus in question was added to larva media (a healthy larva of the Southern U. S. May beetle, Allorhina nitida, placed in a test tube with distilled water and sterilized 1 hour in flowing steam) a putrid odor and gas production was first noted, later a black precipitate settled over the exposed parts of the larva. Whether this black precipitate bears any relation to the blackness of the infected areas in diseased larvae has not been determined, but its occurrence in culture may be significant.

Pathogenicity of the Micrococcus to Other Forms of Animal Life.

Angleworms.

The pathogenesis of the organisms in the mixed culture was determined in the case of angleworms for two reasons, to see whether the angleworm whose presence is desirable in soil would be disastrously affected by one or the other or the combination of both organisms, and should these organisms singly or in mixed culture be used for the extermination of the white grub, it would be of economic importance to know whether the culture used would be detrimental to this friend of the farmer.

Angleworms were placed in ordinarily moist soil artificially infected with the micrococcus and gas-bacillus; some were incised as in the white grub experiment preceding. As no signs of disease were noted after several days sojourn in the infected soil, sufficient water was added to it to produce a saturated condition. Two or three days later, both worms were found dead and liquefied inside; they decomposed entirely later and became slimy.

This experiment was repeated many times, always with the same results.

Microscopical examination of the slimy mass revealed a preponderance of bipolar-staining sporulating bacilli. These bacilli were isolated and found to produce the above results in pure culture, i. e. upon placing angleworms in sterile soil previously inoculated heavily with a broth culture of these bacilli, the angleworms were found liquefied and slimy within two days. These bacilli resembled closely, morphologically and culturally, those introduced with the micrococcus.

The results produced upon the angleworms by inoculating sterile soil with the mixed culture were perhaps caused by the bacilli only, in the presence of an excess of water, or possibly by an association of the two organisms. No definite assertion can be made therefore as to which organism caused the death of the angleworms.

The American Cockroach, Periplaneta americana.

An attempt was made to determine the transmissability of the coccus infection to the large cockroach, Periplaneta americana.

Two live roaches of this species were placed in a sterile dish containing a piece of bread saturated with a broth culture of the micrococcus. After a sojourn of 11 days, the cockroaches were examined. Each roach was infected at the extremities of all six legs and the two hind legs of each were black and splitting or breaking off. One was nearly dead, showing life only by an occasional twitching of the legs. The antennae and setae of the latter were also apparently infected. By consulting the accompanying figure the point and progress of infection can be traced.

The latter roach is designated as A, the former as B. A had both legs off at a, the right leg off at b and both at c. B had the left leg off at a, both at b, right leg off at c and at d.

A was placed in a sterile dish to see if the coccus could be recovered from the feces. Microscopic examination of smears of the feces stained with carbol-fuchsin showed myriads of organisms, micrococci were common, also sporulating bacteria.

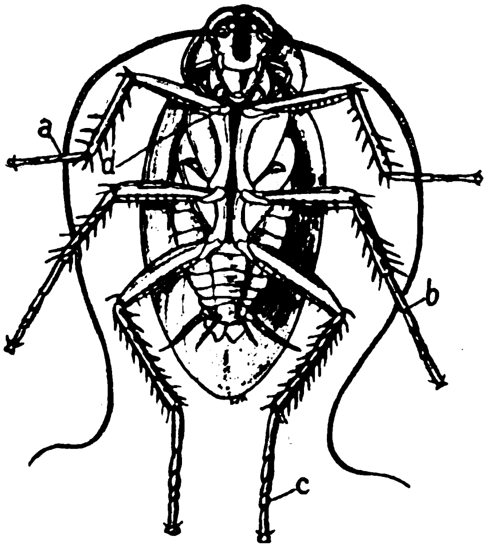


Fig. 5.

One of the infected legs of B was ground up in a mortar, smears and plates were made. The micrococcus was demonstrated in both instances and isolated.

Two other roaches of this same species were treated in the same manner as A and B. One of these showed no infection after 13 days, but a month later one leg was infected; the roach died a few days later. The other specimen was dead and decomposed so badly at the second examination that the presence or absence of infection could not be determined.

Guinea Pigs and Rabbits.

Guinea pigs and rabbits injected subcutaneously and intraperitoneally with a salt solution suspension of the micrococcus showed no ill effects of the inoculation in any way.

Demonstration of the Micrococcus in Soil.

Naturally infected soil, i. e., soil shipped in with the diseased grubs was plated. Although this soil must have contained the infectious material, at the necessary dilutions used no micrococci were found. If the characteristic growth on agar plates will again be noted (See p. 326) this perhaps will offer some explanation as to why the attempts to isolate the organism from soil were always unsuccessful.

Part II.

Experiments with Larvae of Allorhina nitida.

It was supposed that no other healthy larvae could be obtained for experimentation but happily a few specimens of the larvae of the Southern U. S. June beetle, **Allorhina nitida**, which are a different genus of the same family as **Lachnosterna**, were obtained (Feb. 1913) through the kindness of Dr. Geo. D. Shafer of the Entomological Division of this Station. These particular specimens were obtained from South Carolina.

Pathogenicity to Larvae of Allorhina nitida.

To a layman, these larvae have about the same general appearance as our common white grub, differing however in that the specimens evidently in the last period of the larval stage are much larger than those of the same stage in the **Lachnosterna**, have a wedge-shaped, light-brown chitinous plate on either side of the prothorax just above and in front of the prothoracic spiracles, crawl upon their backs instead of upon their venters, and have very much shorter and weaker legs but are much more active.

Disposition was made of the larvae as follows: one was placed in a test tube to which was added distilled water, and sterilized an hour in flowing steam, inoculated with the micrococcus and bacillus and incubated at room temperature. One larva was placed in each of 3 deep culture dishes of sterile soil (sterilized in the hot-air oven at 160—170° C. for 1 hour) to which sterile water had been added.

Two days later the three larvae were examined and found to be active and healthy. At this time, a broth suspension of the micrococcus was added to one dish, of the gas-producing bacillus to the second dish and a mixed suspension of the bacillus and the micrococcus to the third, and in addition enough water to saturate the soil in each.

Twenty-four hours later, the first larva was found to have a marked infection on the chitinous plates on either side of the prothorax. The larva seemed to be less active. A second healthy larva was placed in this soil at this time.

The larva in the soil to which the gas-producing bacillus had been added was found dead, with no lesions.

The third larva was left in uninoculated soil for 4 days. Two days after inoculation with the two organisms, the larva was found alive, with a line

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

of infection on the dorsal side of the last abdominal segment, the whole body was hard and the larva did not respond when irritated.

Two days after the first infection was noticed, the larva first placed in the soil containing the micrococci, was found to be infected in two additional places, near spiracles, and the healthy larva which had later been placed in this inoculated soil was also infected in one place. Twelve days after infection was noted, in the first larva, a new area nearly 4 mm. in diameter near a spiracle and all but one of the legs was found infected. The larva seemed to be dead but upon washing off for the determination of additionally infected areas an occasional twitching of the legs was apparent. This was still noted 24 hours later but the larva was found dead within 48 hours. The second larva in this same container was found to have four or five small infections on the posterior of the abdomen and also on the tip of one of the legs. An examination of the larva four days after being placed in the soil with the mixed culture showed the right front leg off at the last joint before it joins the body, and the stump was characteristically black.

Seven days later, the larva was active but several very small infected areas were noted on both dorsal and ventral portions of the body. At this time the larva in question was placed in the soil containing the pure culture of the bacillus to see if the course of the disease would be hastened. Two days later the larva was still normally active so the soil was saturated with sterile water and reinfected with the gas-producing bacillus.

Five days after the second introduction of the gas-producing bacillus and the saturation of the soil, the larva was re-examined and found to be a little less active; the tip of all three left legs and of the middle right one were infected but the excess of water in the soil had apparently had no marked effect. The next day, however, the larva was found dead, twenty days after being introduced into inoculated soil.

Individual larvae seem to vary greatly in their power of resistance to the micrococcus.

Two healthy larvae obtained later were placed in soil mixed with sphagnum. This soil was made up of a mixture of soils kept in the laboratory which have been in a perfectly dry state for several years. Sufficient water was added and the soil and sphagnum mixed until the compound was of the plasticity of ordinary soil, then the larvae were introduced. No especial precautions were used to prevent the entrance of microörganisms other than the specific micrococci.

Twelve days after being placed in the above soil mixture an examination of the larvae was made and both showed several small but characteristic lesions. The chances for artificial infection were very slight; the soil may have contained the organisms; no experiments have been carried on to ascertain the effect of dessication upon the vitality of the micrococci. This circumstance seems to emphasize the pathogenicity of the micrococcus for its host or perhaps the susceptibility of the larvae of this species to infection even in the absence of abnormal amounts of water in the soil.

Since the above statement was made a consignment of six dozen larvae of the species Allorhina nitida was received from North Carolina[1]);

---

[1]) This occurrence seems to point to the distribution of this disease over a considerable portion of the United States and within quite a wide range of climate. Specimens sent in later (see p. 336) seem to confirm the almost ubiquitous presence of the micrococcus in soil. In a recent communication from Dr. R. H. van Zwa-

out of this number only three showed the absence of infection and one of these three was dead! This may explain the occurrence of infection in the dried laboratory soil; the organisms may have been previously present upon or within the larvae.

Microscopic Examination of Diseased Tissues of a Larva of Allorhina nitida.

Microtome sections were made of the diseased portion of the first larva of this species which became infected. As the micrococcus is Gram-positive in culture, the Gram-Weigert method of staining tissues was used, counterstaining with eosin.

As before mentioned (p. 328) the micrococci found in the subnascent laminae, and the surrounding tissue in the larva of Lachnosterna were a dark brown, almost black in color, the density of the color in the tissue diminishing with the distance from the apparent focus of infection. This diseased portion in all instances failed to stain; the dark brown color is due to a pigment which is evidently not soluble in any of the reagents used in staining, water, alcohol, anilin oil or xylol.

The only well-known distinctly black pigment not derived from hemaglobin (22), (23), (24), produced in living tissues as a result of specific cell activity is an organic substance known as melanin, which is the cause of pigmentation in certain types of tumors and other pathological conditions. This metabolic pigment is autochthonous (25), i. e., found in the cells at the place of formation. Its elementary molecular composition according to Wells (26), is expressed by the following proportion, $N : H : C = 1 : 5 : 5$, „probably being not a single substance of definite composition but including several related but different bodies.“ According to Schmiedeberg this pigment represents the final product of a long series of metamorphoses of albumin and in its formation may be compared to the development of humus. It is generally rich in sulphur in proportion to its carbon content, iron is oftentimes present but is not necessary to the formation of color (Ziegler).

Folsom (16) says that little is known as to the cause of the production of melanism in insects. Warmth is believed by some to be the most potent factor, others attribute it to moisture.

Melanin is insoluble in water, alcohol, ether, chloroform, carbon bisulfid and weak acids but is quite readily dissolved in alkalies, strong acids or boiling alcohol, accordingly sections of the larval tissue were passed through an alcoholic solution of KOH before staining in order to remove the pigment should it be melanotic in character.

The caustic potash dissolved the pigment in the diseased areas allowing the micrococci and tissues surrounding to take the Gram-eosin stain. This method was checked by making a similar stain without previously passing the sections through KOH; the diseased areas and the micrococci showed the characteristic brownish-black pigmentation.

In the „Gram + eosin + KOH“ sections from the larva of the latter

---

leuvenburg (Jan. 30, 1914) of the Porto Rico Agricultural Experiment Station at Mayaguez, he states that "As far as I know, there are no diseased larvae obtainable on the island; all we have collected are healthy". Several shipments of larvae from Porto Rico (March 1914) have shown 100 per cent infected more or less; however, out of 20 grubs received later (April) only 7 showed infection.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

species, Allorhina nitida, micrococci staining blue were found in large numbers scattered through the inner cell structure, occasionally including the muscle fibers, also in masses in the hair follicles and occasionally in the outer chitinous layer of the integument (see Plate III, Figs. 8, 9 and Plate IV, Fig. 10).

In one of the „Gram + eosin — KOH“ stained sections, occasional clusters of large, light-brown pigmented cells were found. (See Plate IV, Fig. 11.) Nothing has been determined as to their nature.

Eosin was used alone as a stain, both with and without the use of KOH. In the absence of KOH, light yellowish to brown micrococci were found in the pigmented tissues. These were colorless wheen previously treated with KOH.

These results seem to establish this pigment as melanotic in character.

Incision experiments with the larvae of Allorhina nitida have resulted much more satisfactorily than with those of Lachnosterna. Results seem to lead to the conclusion that infection enters through some mechanical injury to the outer covering of the grub, e. g., through attacks of other insects, or insect-or fungus-parasites. It is known that these larvae attack each other, especially in confined spaces, (14) and in this way infection may be introduced or spread. Several experiments seem to indicate that if such injuries are allowed to heal before the grub is subjected to infection, no lesion is found.

It has been previously mentioned (p. 333) that a consignment of six dozen Allorhina nitida larvae showed only 4 per cent apparently healthy larvae. The infection of the larvae remaining was but slight in most cases, the general lesions being not more than 1—2 mm. in diameter; the larvae were most active.

An interesting fact and one worthy of note was observed; after these larva had been left in soil in the laboratory for a month or so, earthen cells were found and when these were examined after a period of three months, it was found that a large percentage of these larvae had developed into beetles. This corresponds to Krassilstschik's observations: „These (referring to the black spots) do not hinder the larvae from being in the best state of health, from being transformed into a chrysalid, etc.“ (translation).

An infected larva of the genus Lachnosterna had also developed into a beetle.

From these occurrences, it may be safely concluded that infection with this micrococcus is not necessarily fatal to the completion of the life cycle of the June beetle in question. In addition, this fact seems to point strongly to the previous theory that the association of the two organisms found on plates made from badly diseased larvae, is pertinent and perhaps necessary in the consideration of the fatality of the disease. Further studies are being made to determine if possible the pertinence of this association of the gas-producing bacillus and the micrococcus.

Geographic Distribution of the Micrococcus.

Nearly all Lachnosterna larvae received from the southern portion of the lower peninsula of Michigan, were badly diseased. (Season of 1912).

Allorhina nitida larvae received in the spring of 1913 from North Carolina showed a large percentage (96 per cent) of diseased specimens. (Infection only slight, however.)

Lachnosterna larvae received during the fall of 1913 from Maryland, Michigan and Illinois through the courtesy of John J. Davis, Entomological Assistant of the U. S. Dept. of Agriculture (Lafayette, Ind.), almost without exception were infected, quite extensively in many cases.

It is evident that this organism has quite a wide distribution in the United States.

Krassilstschik's observations lead to the conclusion that this micrococcus is found in Europe (France) also.

One hundred per cent. of the larvae received from Porto Rico (March, 1914) were more or less infected.

Since this paper was given at the Michigan Academy of Science at Ann Arbor in April, 1913, requests have been received from the Porto Rico Experiment Station at Rio Piedras and also from Mayaguez, P. R. for cultures of the Micrococcus with an idea toward using this as a means of combating the species of white grub which is so active in destroying the sugarcane on this island. No definite results have been obtained as yet from the use of these cultures.

Summary and Conclusions.

The June beetle larvae or "white grubs" were prevalent during the season of 1912.

Their occurrence was accompanied by the appearance of a bacterial disease which is characterized by a blackening of the affected parts. The organism responsible for the infection is a Micrococcus which was found microscopically in almost pure culture on agar plates made from a diseased portion of a living grub. It is frequently accompanied by a gas-producing bacillus from which it is separated with difficulty.

The micrococcus exists in soil and is present in many soils in Michigan, Illinois, Maryland, North Carolina, U. S. A., and most probably in other states and countries.

This microörganism grows well on ordinary media, but much better on larva media (-gelatin, -agar, -broth and larva itself).

It stains well with ordinary aqueous-alcoholic stains, showing clearly the dividing cells; is not acid-fast but is Gram-positive.

The disease was successfully reproduced in a healthy larva of the same species by placing the larva in artificially infected soil, making an incision in the integument.

Parasitic insects or fungi, or the larvae themselves may add materially to the chance of infection by producing a predisposition to the disease merely through mechanical injury.

The characteristic lesions were also produced in several healthy specimens of Allorhina nitida simply by placing them in water-soaked, sterilized soil to which a broth suspension of the micrococci had been added.

Individual larvae of one genus seem to vary greatly in their power of resistance to the micrococcus, the younger seeming to be the more susceptible. Larvae of the genus **Lachnosterna** seem to be less resistant than those of the genus Allorhina.

Stained sections made from the diseased portions of larvae demonstrate micrococci unstained but dark brown in color imbedded in the laminae (also unstained and brownish in color) of the integument. Large light-brown pigmented cells also are found within the body cavity. (See Plate IV, Fig. 11.)

This brownish-black color is due to a pigment presumably melanotic in character, most probably directly or indirectly produced by the activity of the bacterial cells within the larval tissue.

This micrococcus was found to be pathogenic to the cockroach Periplaneta americana also, the disease pursuing its course in much the same fashion as in the white grub, the infection however apparently limiting itself to the legs.

It cannot be definitely stated whether the micrococcus is pathogenic to angleworms.

Several unsuccessful attempts were made in isolating the micrococcus from naturally infected soil.

Excessively wet soil favors the progress of the disease. In fact this factor may be considered as probably the most important one concerned in the fatality of the infection.

Other organisms existent in the soil may cause an infection of the larvae; a gas-producing bacillus (B. septicus insectorum? [14]) found on the plates seems to add materially to the fatality of the disease under certain conditions; this bacillus may be the primary invading organism.

The micrococcus did not lose its pathogenicity after existing over a year under artificial cultivation.

It has not been possible as yet to try out this organism as a remedial measure for the destruction of the white grub. This effort will be made, however, at the earliest opportunity. The Porto Rico Experiment Station is taking up this matter in behalf of the sugar-cane industry, cultures having been sent to Rio Piedras and Mayaguez for this purpose.

It seems from the definite results obtained by inoculating and saturating soil that this Micrococcus may have a future field of usefulness in combating the white grub problem, especially in coöperation with other parasitic diseases to which the larvae are subject.

Again, this micrococcus having the power of infecting larvae of another genus (Allorhina nitida) and also insects in the adult form (Periplaneta americana) seems to suggest even wider possibilities, foremost of which is the control of other insect larva pests which work in the soil.

Many thanks are due Prof. R. H. Pettit and Dr. G. D. Shafer for giving access to the available literature and for many valuable suggestions. I am likewise very much indebted to the latter for furnishing species of the Southern U. S. June beetle.

Mr. John J. Davis, with the Government Bureau of Entomology and Dr. R. H. van Zwaleuvenburg of Mayaguez, Porto Rico have also kindly furnished Lachnosterna larvae for investigation.

Bibliography.

1. Sanderson, E. Dwight, Insects injurious to staple crops, 1912. pp. 44—48.
2. Packard, A. S., The insects of May, pp. 162—164; The insects of June, pp. 220—224, American Naturalist, Vol. I. 1867.
3. —, Entomological Calendar for May, pp. 163—165; Entomological Calendar for June, pp. 219—221, American Naturalist, Vol. 2. 1868.
4. Riley, Chas. V., Annual Reports of the State Entomologist of Missouri beginning with the year 1874.
5. Forbes, S. A., Field experiments and observations on insects injurious to Indian corn (1905) Bul. 104, Univ. of Ill. Agr. Expt. Sta.
6. —, On the life history, habits and economic relations of the white grubs and May beetles. Bul. 116. Univ. of Ill. Agr. Expt. Sta. (1907).
7. —, The more important insect injuries to Indian corn. Bul. 95. (1904). Univ. of Ill. Agr. Expt. Sta.
8. —, Insect injuries to the seed and root of Indian corn. Bul. 44. (1896). Univ. of Ill. Agr. Expt. Sta.
9. Chittenden, F. H., Biologic notes on the May beetle, Lachnosterna arcuata Sm. Bul. 19. n. s., Bureau of Entomology. U. S. Dept. of Agric. 1899. p. 74—80.
10. —, Insects injurious to violet, rose and other ornamental plants. Bul. 27. n. s., Bur. of Entomol. U. S. Dept. of Agric. 1901. p. 74—76.
11. —, Some insects recently injurious to truck crops. Bul. 40. n. s., Bur. of Entomol. U. S. Dept. of Agric. 1903. p. 113.
12. Britton, Dr. W. E., Annual Report of State Entomologist of Connecticut for year of 1912.
13. Van Dine, D. L., Progress report on introduction of beneficial parasites into Porto Rico. First Report of the Board of Commissioners of Agriculture of Porto Rico. 1912. p. 33.
14. Krassilstschik, I., La Graphitose et la Septicémie chez les Insectes. Deux maladies des larves lamellicornes causée par des bacteries. Mémoires Soc. Zool. en France. t. VI. pp. 245—285. 1893.
15. Pettit, R. H., Insects of the garden. Bul. 233. Mich. Agr. Expt. Sta. 1905.
16. Folsom, J. W., Entomology with respect to its biological and economic aspects. p. 201.
17. Lebert, Berliner Entomol. Zeitschr. 1858.
18. Chester, F. D., Manual of Determinative Bacteriology. 1901. p. 91.
19. Seeley, D. A., Monthly meteorological summary for months of July, August and September, 1912. Lansing Station, Weather Bureau, U. S. Dept. of Agriculture.
20. Müntz, A., Evaporation from the soil and plants as a factor in the persistence of rainy and cold weather. Compt. Rend. Acad. Science t. 155. 1912. no. 11.
21. Reiff, Wm., The Wilt Disease, or Flachérie, of the Gypsy Moth, 1911.
22. McFarland, J., Textbook of Pathology. 1910. p. 150.
23. Adami, J. G., and Nicholls, A. G., Principles of Pathology. Vol. 1. 1910. p. 828.
24. Delafield, F. and Prudden, T. M., Textbook of Pathology. 1912. p. 55.
25. Ziegler, E., General Pathology. 1908. p. 238.
26. Wells, H. G., Chemical Pathology. 1907. p. 393—399.
27. Webster, F. M., Some things that the grower of cereal and forage crops should know about insects. Yearbook of the U. S. Dept. of Agric. for the year 1908. p. 381.
28. Packard, A. S., Textbook of Entomology. 1898. p. 38.
29. Henneguy, L. F., Les Insectes. p. 570, 588.

a f e r
:tions.
es of

ology
have

ı—48.
). 220

ır for

ri be-

ndian

May

v. of

f Ill.

r n a
899.

Bur.

nol.

for

nto
ɔrto

ɔux
en

ːts.

ıst
re.
ce

0.

5.

d
.

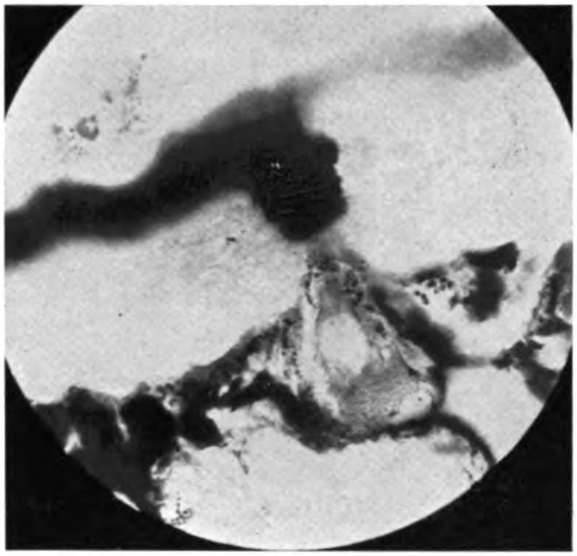


Fig. 10.

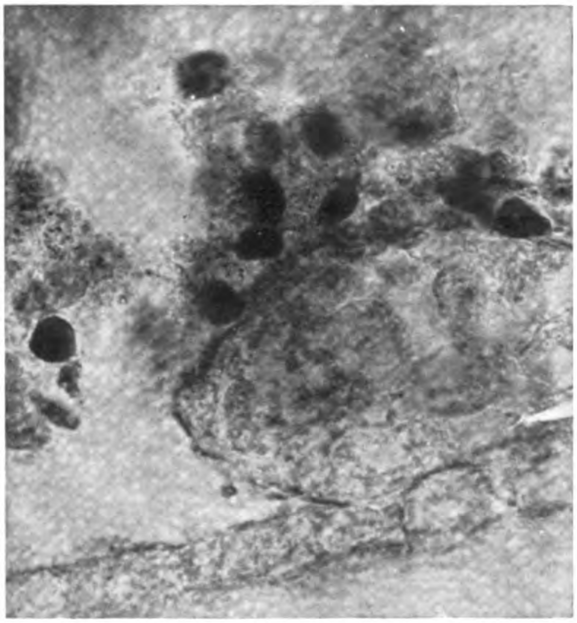


Fig. 11.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

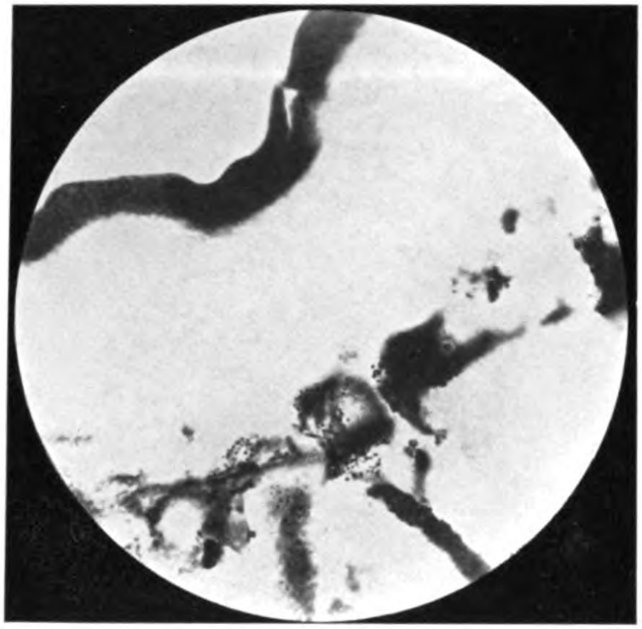


Fig. 8.

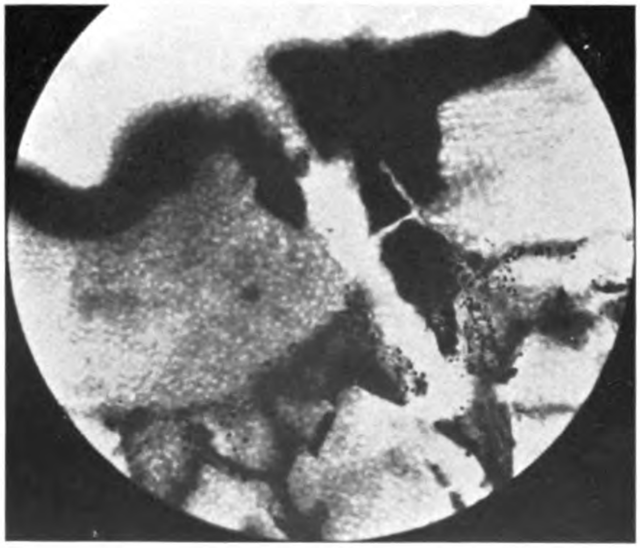


Fig. 9.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

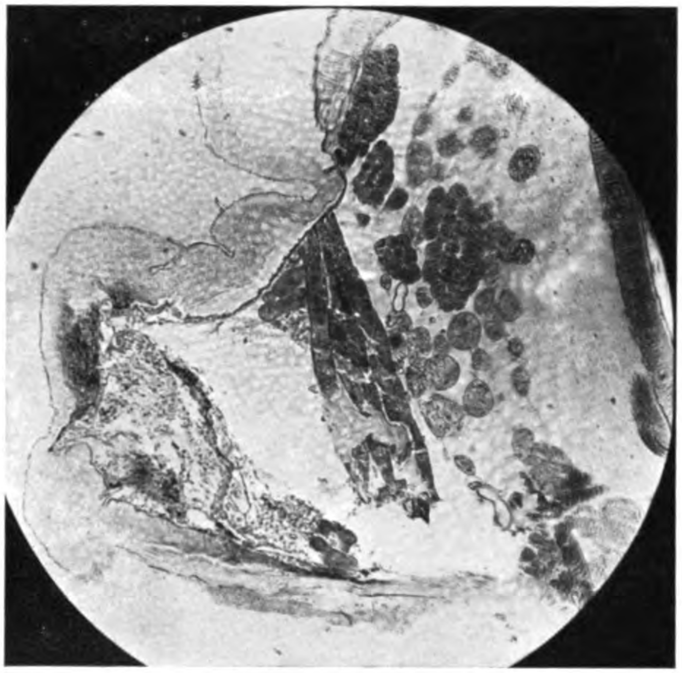


Fig. 6.

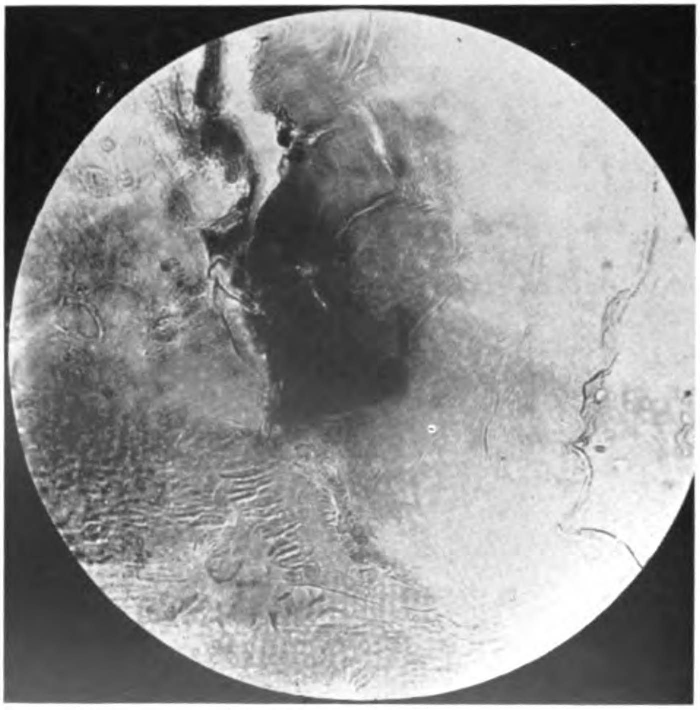


Fig. 7.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

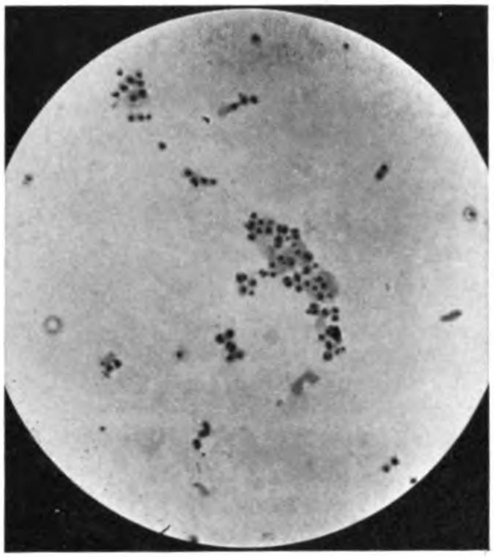


Fig. 1.

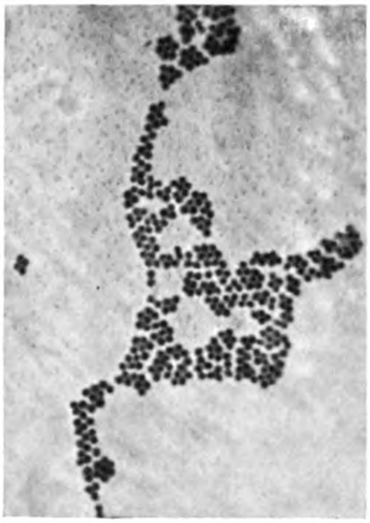


Fig. 2.

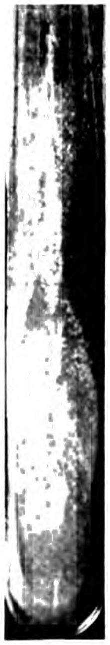


Fig. 3.

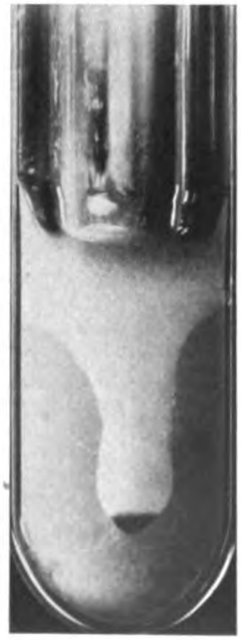


Fig. 4.

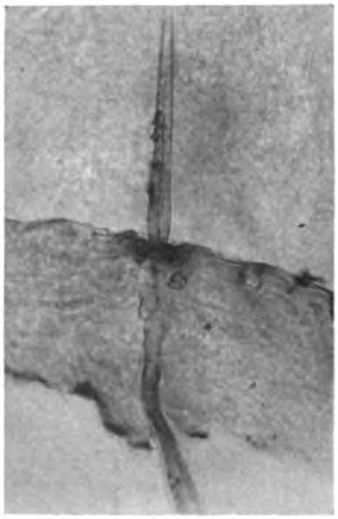


Fig. 5.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Nachtragskorrektur zu Bd. 41, No. 11/17, p. 339.

Index of Figures.

Fig. 1. Normal larva of *Lachnosterna arcuata*, enlarged one-fourth. Fig. 46 (from *Chittenden*), 1908 Yearbook of the U. S. Dept. of Agriculture (27). (See p. 323 of text.)

Fig. 2. June beetle larvae, *Lachnosterna* spp. in successive stages of disease. Natural size. (See p. 323 of text.)

Fig. 3. Leg joint of an insect. Fig. 22. *Packard's* Textbook of Entomology. Notice that muscular structure comes to the surface at the point of articulation. (See Plate II, Fig. 6.) (See p. 328 of text.)

Fig. 4. Integument, showing chitinous ring of segments with membranous articulation (see Plate II, Fig. 6). Fig. 17. *Packard's* Textbook of Entomology. (See p. 328 of text).

Fig. 5. American cockroach, *Periplaneta americana*. Second roach in Fig. 1, Cir. 51, n. s. Bur. of Ent. U. S. Dept. of Agriculture. Letters indicate place of infection (See text p. 331).

Index of Plates.

Plate I.

Fig. 1. *Micrococcus nigrofaciens*, × 1000, from a 9 day old dextrose agar culture. Methylene blue. Shows varying sizes and gonococcus-like forms. Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Fig. 2. *Micrococcus nigrofaciens*, × 1333, 6 day old larva medium culture. Gram stain. Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30. Notice the regular groupings in twos, threes (triangular), tetrads and fours in diamond shape, also in sixes (triangular) and sevens (hexagonal with coccus in center).

Fig. 3. Agar streak culture 3 days old, showing separate colonies, reduced.

Fig. 4. Gelatin stab, larva-gelatin culture 9 days old. Natural size, showing deposition of granular sediment at bottom of liquefied funnel, slightly enlarged.

Fig. 5. Hair, follicle and root (*Lachnosterna* larva), × 300. Zeiß Oc. 2. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30. Illustrative of how infection may enter from without. (See Plate III, Fig. 9 and Plate IV, Fig. 10).

Plate II.

Fig. 6. Normal and diseased tissues. × 67. Zeiß Oc. 2 and Obj. 16. The diseased tissue is the dark brown to black portion of the integument — *not* stained.

Fig. 7. Diseased tissue of integument, × 333, section of *Lachnosterna* larva. No cocci evident, showing muscular attachment. Zeiß Oc. 2. Leitz Apo Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Plate III.

Fig. 8. *Micrococcus nigrofaciens*, × 667, in cells subnascent to the integument (Gram + Eosin + KOH, Section of *Allorhina nitida*). Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Fig. 9. *Micrococcus nigrofaciens*, × 667, in a break in the integument (Eosin + Gram + KOH. *Allorhina nitida*). Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Plate IV.

Fig. 10. *Micrococcus nigrofaciens*, × 667, in a hair follicle (Eosin + Gram + KOH. *Allorhina nitida*). Zeiß Oc. 4. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Fig. 11. Pigmented cells, × 667, in tissues underlying the integument. Stained with eosin alone. Zeiß Oc. 4. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30. These cells are dark brown in color, not taking the stain.

Photomicrographs and other photographs by author.

Index of Figures.

Fig. 1. Normal larva of Lachnosterna arcuata, enlarged one-fourth. Fig. 46 (from Chittenden), 1908 Yearbook of the U. S. Dept. of Agriculture (27). (See p. 323 of text.)

Fig. 2. June beetle larvae, Lachnosterna spp. in successive stages of disease. Natural size. (See p. 323 of text.)

Fig. 3. Leg joint of an insect. Fig. 22. Packard's Textbook of Entomology. Notice that muscular structure comes to the surface at the point of articulation. (See Plate II, Fig. 6.) (See p. 328 of text.)

Fig. 4. Integument, showing chitinous ring of segments with membranous articulation (see Plate II, Fig. 6). Fig. 17. Packard's Textbook of Entomology. (See p. 328 of text).

Fig. 5. American cockroach, Periplaneta americana. Second roach in Fig. 1, Cir. 51, n. s. Bur. of Ent. U. S. Dept. of Agriculture. Letters indicate place of infection (See text p. 331).

Index of Plates.

Plate I.

Fig. 1. Micrococcus nigrofaciens, × 1500, from a 9 day old dextrose agar culture. Methylene blue. Shows varying sizes and gonococcus-like forms. Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Fig. 2. Micrococcus nigrofaciens, × 2000, 6 day old larva medium culture. Gram stain. Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30. Notice the regular groupings in twos, threes (triangular), tetrads and fours in diamond shape, also in sixes (triangular) and sevens (hexagonal with coccus in center).

Fig. 3. Agar streak culture 3 days old, showing separate colonies, reduced.

Fig. 4. Gelatin stab, larva-gelatin culture 9 days old. Natural size, showing deposition of granular sediment at bottom of liquefied funnel, slightly enlarged.

Fig. 5. Hair, follicle and root (Lachnosterna larva), × 600. Zeiß Oc. 2. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30. Illustrative of how infection may enter from without. (See Plate III, Fig. 9 and Plate IV, Fig. 10).

Plate II.

Fig. 6. Normal and diseased tissues, × 100. Zeiß Oc. 2 and Obj. 16. The diseased tissue is the dark brown to black portion of the integument — not stained.

Fig. 7. Diseased tissue of integument, × 500, section of Lachnosterna larva. No cocci evident, showing muscular attachment. Zeiß Oc. 2. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Plate III.

Fig. 8. Micrococcus nigrofaciens, × 1000, in cells subnascent to the integument (Gram + Eosin + KOH, Section of Allorhina nitida). Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Fig. 9. Micrococcus nigrofaciens, × 1000, in a break in the integument (Eosin + Gram + KOH. Allorhina nitida). Zeiß Oc. 8. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Plate IV.

Fig. 10. Micrococcus nigrofaciens, × 1000, in a hair follicle (Eosin + Gram + KOH. Allorhina nitida). Zeiß Oc. 4. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30.

Fig. 11. Pigmented cells, × 1000, in tissues underlying the integument. Stained with eosin alone. Zeiß Oc. 4. Leitz Apo. Oil immers. 2 mm. Ap. 1.30. These cells are dark brown in color, not taking the stain.

Photomicrographs and other photographs by author.

Nachdruck verboten.

Über den Einfluß des Lichtes auf die Sprossung der Hefe.

[Aus dem pflanzenphysiol. Institut der k. k. Universität in Wien; No. 64 der zweiten Folge.]

Von stud. phil. **Ludwig Buchta.**

Mit 1 Textfigur.

Daß die Vermehrungsgeschwindigkeit von Saccharomyces cerevisiae und anderen Hefen von verschiedenen äußeren Faktoren, wie von Temperatur, Sauerstoffgehalt, Beschaffenheit und Konzentration des Nährbodens usw. beeinflußt wird, ist von Chr. Hansen, R. Pedersen, Fr. Heß, C. Soldan, S. Archleb[1]) und vielen anderen in einwandfreier Weise gezeigt worden. Dagegen scheint das Licht, das doch im Leben höherer und niederer Pflanzen eine so wichtige Rolle spielt, bis jetzt in seiner Wirkung auf die Zellsprossung stark unterschätzt worden zu sein.

Durch eine zufällige Beobachtung habe ich mich entschlossen, die Abhängigkeit der Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe vom Licht nochmals zu untersuchen und bin zu Resultaten gekommen, welche auf eine viel größere Lichtempfindlichkeit dieses Organismus schließen lassen, als man nach den Arbeiten von L. Kny und W. Lohmann erwarten würde[2]). Da die Ursache für die abweichenden Ergebnisse in der Methode zu suchen ist, nach welcher die Bestimmung der Vermehrungskraft erfolgte, mag zunächst kurz das Verfahren beider Autoren besprochen und dann meines im Gegensatz dazu behandelt werden.

Die Methoden Knys und Lohmanns sind im wesentlichen charakterisiert durch die Anwendung von zahlreichen, zunächst nicht völlig, später völlig isolierten Zellen, die in erstarrende Nährmedien ausgegossen wurden. Die Zählung erfolgte summarisch, nachdem am Versuchsschluß durch bekannte Mittel wie Kälte, Eintrocknen, Pikrinsäure und andere eine weitere Sprossungsmöglichkeit ausgeschlossen worden war. Kny verwendete in Quadrate eingeteilte Objektträger, Lohmann quadratisch gegossene Nährböden zur Abzählung. Bezüglich der näheren Details muß auf die Arbeiten selbst verwiesen werden. Nur das eine möchte ich als besonders wichtig anführen, daß nur in einem einzigen Falle, und zwar von Lohmann beim Versuch mit direktem Sonnenlicht die Zellen markiert worden waren, so daß in diesem Fall wirklich immer dieselben Zellen gezählt wurden — nur diesen Versuch kann ich nach meinen heutigen Erfahrungen für beweisend ansehen —, sonst begnügten sich beide Autoren, die jeweilig aus den gut durchgeschüttelten und denkbar gleichmäßig auf den Zählplatten verteilten Zellen aufgekommenen Kolonien zu zählen und aus den gewonnenen Werten den Mittelwert zu bestimmen.

Endlich mögen hier noch kurz die in Anwendung gebrachten Lichtquellen und Lichtintensitäten und die wichtigsten Resultate Erwähnung finden.

---

[1]) Literatur siehe bei Lafar, Fr., Handb. d. techn. Mykologie. Bd. 4. Jena 1905—1907.

[2]) Kny, L., Die Beziehungen des Lichtes zur Zellteilung bei Saccharomyces cerevisiae. (Ber. d. D. bot. Gesellsch. Bd. 2. 1884. H. 3.) — Lohmann, W., Über den Einfluß des intensiven Lichtes auf die Zellteilung bei Saccharomyces cerevisiae und anderen Hefen. [Inaug.-Dissert.] Rostock 1896.

Die Lichtquelle **Knys** bestand aus 5 nebeneinander gestellten flachen Gasflammen. Es konnte kein Unterschied zwischen belichteten und verdunkelten Objekten konstatiert werden.

Die Lichtquellen **Lohmanns** waren:

1. Das diffuse Tageslicht, das nur geringe Unterschiede in der Zellsprossung bewirkte, wie 7,5 : 8 oder 5,0 : 5,8 zugunsten der verdunkelten Zellen.
2. Direktes Sonnenlicht. Die belichteten Zellen blieben völlig im Wachstum zurück, während sich die unbelichteten normal entwickelten. Bei diesem Versuch waren die zu zählenden Kolonien markiert.
3. Elektrisches Licht. Das Vermehrungsverhältnis von belichteten zu verdunkelten Zellen war 9,85 : 11,72 und 10,77 : 12,36.
4. Siemssche Differentialbogenlichtlampe. Bei der Intensität von 11 590 Meterkerzen war das Vermehrungsverhältnis 7,15 : 9,45 oder 6,73 : 12,8, bei der Intensität von 8000 Meterkerzen 9,31 : 15,7 oder 8,6 : 12,7 zugunsten der verdunkelten Zellen.

Bei der Kritik der Methode der beiden Autoren, die sich bisher meines Wissens allein mit dem Lichteinfluß auf das Wachstum der Hefe beschäftigt haben, muß wohl der Jahreszahl gedacht werden, die die Publikationen tragen[1]). Im Jahre 1884 erschien die Arbeit **Knys**, 1896 die Arbeit **Lohmanns**. Welche Fortschritte hat nun seither die Reinkultur aufzuweisen! Die von der einzelnen Zelle ausgehende Kultur gehört bei gewissen Untersuchungen zu den Selbstverständlichkeiten, über die man keine Worte mehr macht.

Es war daher natürlich, daß ich mich der bei der Einzellkultur gewonnenen Erfahrungen bediente und sie in passender Weise für meine Zwecke verwertete, womit ich alle mit der Methode **Kny-Lohmann** verknüpften Fehler (Aussaat schon sprossender mit nicht sprossenden Zellen) und damit zusammenhängende Ungleichmäßigkeiten der Ergebnisse vermied.

Mein Verfahren bestand also, im Gegensatz zu dem von **Kny** und **Lohmann**, um das Wesentliche gleich hervorzuheben, im Ausgehen jeweils von einer einzigen, nicht sprossenden Zelle, auch ermöglichte sie die direkte Kontrolle jeder einzelnen Zelle und der daraus entstehenden Sproßkolonie bei der Vergrößerung Objektiv 7 und Okular 4 von **Reichert**. Wesentlich ist es auch, daß die zur Beobachtung gelangten Zellen gleich groß sind. Eine sorgsame Auswahl der Zellen ist unbedingt notwendig, weil solche Zellen, die schon eine kleine Protuberanz oder gar eine Doppelzelle zeigen, nach meinen Beobachtungen den ausgesprochenen Einzelzellen gegenüber, was die Vermehrungsgeschwindigkeit anlangt, außerordentlich im Vorteil sind.

Als Untersuchungsmaterial diente mir eine Würzegelatinekultur von Saccharomyces cerevisiae (Frohberg) und eine solche von S. Ludwigii, die mir in liebenswürdiger Weise von Herrn Prof. Dr. H. **Zikes** aus den Vorräten der Akademie für Brauindustrie in Wien zur Verfügung stellte.

Die Herstellung der Untersuchungspräparate erfolgte nach dem Prinzipe der **Lindner**schen Einzellkultur[2]). In eine mit sterilisierter Bierwürze

---

[1]) Eine Besprechung der Arbeit **Lubimenkos** und **Frolow-Bagreiews** kann unterbleiben, da beide Autoren den Einfluß des Lichtes auf die Gärung der Hefe untersuchten. Es ist nur interessant, daß sie eine Hemmung auch des Gärungsprozesses (der Kohlensäure-, Alkoholentwicklung) im Lichte konstatierten, was mit meinen gleich anzuführenden Befunden sehr gut übereinstimmt. **Lubimenko**, W. u. **Frolow-Bagreiew**, Compt. rend. T. 154. 1912. p. 226.

[2]) **Lindner**, P., Wochenschr. f. Brauer. Bd. 10. 1893. p. 1354; Ebenda. Bd. 11. 1894. p. 697.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

zur Hälfte gefüllte Epreuvette wurde von der Würzegelatinekultur eine ganz kleine Probe von der zu untersuchenden Hefe überimpft, durch sorgfältiges Schütteln möglichst gleichmäßig verteilt und so etwa 1—2 Stunden stehen gelassen, damit sich die Hefe an das neue Nährmedium gewöhne. Nach abermaligem Schütteln wurden mittels einer sterilisierten Zeichenfeder auf einem Deckgläschen reihenweise Tröpfchen von dieser Suspension gemacht, worauf dieses mit den Tröpfchen nach unten auf eine Böttchersche Kammer mit Vaselin aufgeklebt wurde, auf deren Boden ein Tropfen destilliertes Wasser die Dunstsättigung ermöglichte. Diejenigen Tröpfchen, in welchen nur eine einzige Zelle von den obenerwähnten Eigenschaften war, wurden mit Tusche genau markiert.

Das so adjustierte Präparat brachte ich in eine feuchte Kammer. Diese bestand in einem 23 cm hohen und 14 cm breiten Glaszylinder, der mit der Öffnung auf eine große Kristallisierschale gestellt wurde. Die Innenseite des Zylinders war zur Hälfte mit Filtrierpapier ausgekleidet, die Schale mit einer Wasserschichte von etwa ½ cm Höhe gefüllt. Dadurch war durch die Dunstsättigung der Kammer reichlich gesorgt. Ein entsprechendes Gestell im Innern der Kammer diente zur Aufnahme der Präparate und zur Befestigung eines Thermometers.

I. Versuche über den Einfluß weißen Lichts.

Zur Beobachtung gelangte beim ersten Versuch, der mich nur mit der Art und Weise der Sprossung näher bekannt machen sollte, eine einzige Zelle. Die Aufstellung des Versuches erfolgte am 11. November um 9 Uhr früh in der Nähe eines nach Norden gelegenen Fensters. Direkte Sonnenstrahlen trafen also das Präparat nicht. Um 3 Uhr nachmittags war die erste Sprossung fast vollkommen beendet und 1 Stunde später begann jede dieser Zellen wieder zu sprossen. Um 6 Uhr abends waren 4 Zellen vorhanden, davon 2 kaum halb so groß als die beiden anderen. Ich ließ den Versuch über Nacht an derselben Stelle stehen. Trotzdem nun in der Nacht die Temperatur merklich niedriger war, weil der Raum, in dem der Versuch stand, während der Nacht ungeheizt blieb, war zu meinem Erstaunen die entstandene Kolonie so riesenhaft groß, daß an ein Zählen der Zellen nicht zu denken war. Es konnte also nur die Dunkelheit die Ursache dieser rapiden Vermehrung sein.

Um mich davon zu überzeugen, machte ich am nächsten Tag folgenden Versuch. Es wurden 2 Präparate mit je 3 markierten Zellen hergestellt und jedes Präparat unter je eine Kammer gebracht, wovon die eine mit einem Zinsturz bedeckt wurde. Die Thermometer in den Kammern waren vorher auf ihre Gleichheit geprüft. Die Aufstellung des Versuches erfolgte in der Nähe eines Fensters, welches zur Abhaltung direkter Sonnenstrahlen mit Seidenpapier verdeckt war. Die Temperaturen wurden durch Kühlwasser geregelt, was übrigens selten notwendig war, da sie fast gar nicht differierten. Das Resultat entsprach vollkommen den Erwartungen. Während die im Licht um 5 Uhr 30 Minuten abends 2—4 Zellen sichtbar waren, übertrafen die Kolonien in der verdunkelten Kammer jene um mehr als das doppelte. Keine einzige Zelle zeigte weniger als 8 Zellen[1]).

---

[1]) Zu denselben Resultaten kam auch Herr Professor H. Zikes, der zur Kontrolle Versuche in ähnlicher Weise in der Akademie für Brauindustrie im diffusen Tageslicht durchführte.

Ich ging nunmehr daran zu untersuchen, welchen Einfluß das Licht einer gewöhnlichen elektrischen Birne auf die Vermehrung der Hefe ausübt.

Vor die Lichtquelle wurden die Versuchsobjekte, genau so verbreitet wie in dem früheren Versuch, auf eine Distanz von 35 cm aufgestellt. Diese Distanz wurde übrigens später, um die Temperaturen in Licht und Dunkel gleichzuhalten, mehr oder weniger verändert, so daß auch der Einfallswinkel des Lichtes zwischen 30° und 45° schwankte. Um die Wärmestrahlen unwirksam zu machen, wurde zwischen Lichtquelle und Versuchsobjekte eine Glasküvette von 4 cm lichter Weite gebracht, die mit Leitungswasser gefüllt war. Nach Beendigung des Versuches wurden die entstandenen Kolonien sofort auf die Zahl der Zellen geprüft, so daß während der kurzen Zeit des Zählens ein Weitersprossen das Resultat nicht beeinträchtigen konnte. Die Zählungen wurden bei Verwendung des Objektivs 7 und des Okulares 4 durchgeführt und zwar in der Folge so, daß zuerst die Kolonien, die im Dunkeln, dann die Kolonien, die im Licht entstanden waren, zur Zählung gelangten. Ausnahmslos wurden auch die kleinsten Sprossungen in die Zählung einbezogen.

Die Aufstellung der Versuche, deren Resultate im folgenden wiedergegeben sind, erfolgte in der Dunkelkammer des pflanzenphysiologischen Institutes.

Versuch 1.
Vom 25. XI. 3 h. 15′ nachm. bis 26. XI. 8 h. 00′ vorm.

Tag	Uhr	Temperaturen (Celsius)		Aus einer Zelle sind entstanden	
		Dunkel	Hell	Dunkel	Hell
25. XI.	3 h. 15′	18	18	48	17
„	4 h.	18	18	44	28
„	5 h.	18,25	18,1	42	24
„	5 h. 30′	18,25	18,25	32	15
„	6 h.	18,5	18,75	35	14
26. XI.	8 h.	19,5	19,5	56	23
				42	18

Das Verhältnis der belichteten (Lz) zu den verdunkelten (Dz) Zellen beträgt nach 17-stündiger Versuchsdauer 42,7 : 20.

Versuch 2.
Vom 28. XI. 3 h. 45′ nachm. bis 29. XI. 8 h. 30′ vorm.

Tag	Uhr	Temperaturen (Celsius)		Aus einer Zelle sind entstanden	
		Dunkel	Hell	Dunkel	Hell
28. XI.	3 h. 45′	17	17	76	34
„	4 h.	17,25	17,5	63	36
„	5 h.	17,5	17,5	73	43
„	6 h.	18	18	67	30
29. XI.	8 h.	19,3	19,5	85	32
„	8 h. 30’	19,3	19	74	40
				78	46

Das Verhältnis der belichteten (Lz) zu den verdunkelten (Dz) Zellen beträgt nach 17¾-stündiger Versuchsdauer 73,7 : 37,1.

Da die beiden obigen Protokolle zeigen, daß die Temperaturen nur um Zehntelgrade schwanken und die eingetragenen Einzelzählungen die Exaktheit des Zählorgans illustrierten, mögen in der Folge bloß die Grenzwerte der Temperaturen und die Mittelwerte der Zählungen notiert werden.

Versuch			Beobachtungs-material	Nähr-boden	Temperaturen (Celsius)				Zählungs-ergebnis		Quotient
					Dunkel		Hell				
vom	bis	Dauer in Stunden			höchste	niederste	höchste	niederste	Dz	Lz	
1912											
2. XII.	3. XII.	15	Sacch. cerevisiae	Bier-würze	21,3	19	21,5	19	43	21	2,05
5. XII.	6. XII.	14½	„	„	19,5	17,5	19,2	17,5	48,1	24,8	1,94
6. XII.	7. XII.	16	„	„	20,2	19	20,3	19	59,1	27,1	2,18
1913											
18. IX.	19. IX.	15½	„	„	14,2	13,75	14,2	13,75	7,33	3,2	2,29
„	„	23½	„	„	14,2	13,75	14,2	13,75	17	5,2	3,2
19. IX.	20. IX.	15	„	„	14,5	14	14,75	14	9,3	4,7	1,9
3. VI.	3. VI.	8	„	1,8% Würz.-agar[1])	23,2	22,5	23,25	22,5	6,16	2,5	2,45
28. V.	29. V.	17½	Sacch. Ludwigii	Bier-würze	20,5	19,3	20,6	19,5	74,4	38,8	1,9

In den folgenden Versuchen war die Lichtquelle mit einer Senebierschen Glocke, die mit Wasser gefüllt war, überdeckt und in den Entfernungen 35 cm, 140 cm und 280 cm von ihr wurden Präparate mit markierten Einzelzellen in feuchten Kammern untergebracht. Da sich das Wasser oft stark erwärmte, mußte es öfters gewechselt werden. In der folgenden Tabelle sind unter L_{35}, L_{140}, L_{280} die Mittelwerte der in den entsprechenden Entfernungen von 35, 140, 280 cm unter Dz, wie in den früheren Versuchen, die Mittelwerte der im Dunkeln entstandenen Zellen zu verstehen. Die Quotienten drücken das Verhältnis der im Dunkeln und der in den jeweiligen Entfernungen entstandenen Kolonien aus, und zwar in der Reihenfolge a = Dz : L_{35}, b = Dz : L_{140}, c = Dz : L_{280}.

Versuch			Beobachtungs-material	Nähr-boden	Temperaturen (Celsius)				Zählungsergebnis				Quotienten		
					Entfernung von der Lichtquelle			Dunkel							
vom	bis	Dauer in Std.			35 cm	140 cm	280 cm		L 35	L 148	L 280	Dz	a	b	c
15. V.	16. V.	20½	Sacch. cerevisiae	Bier-würze	15—16	15	15	15	10,66	11,83	15,86	19,8	1,86	1,67	1,25
19. V.	19. V.	8½		„	14,5—15	14,5	14,5	14,5	2,6	2,5	4,5	7,7	2,9	3,1	1,7
3. VI.	4. VI.	22½		„	16,5-17,5	17	17	17	40,2	62,5	69	71,7	1,78	1,15	1,04

---

[1]) Die Vesuche mit Würzeagar wurden in der Weise durchgeführt, daß eine geringe Menge einer Hefe-Würzesuspension mit einem flüssig gemachten Würzeagar vermischt wurde, worauf nach kräftigem Schütteln Tröpfchenkulturen angelegt wurden. Der weitere Vorgang entspricht vollkommen dem der früheren Versuche, so daß also im wesentlichen keine Änderung der Methode vorliegt.

Aus den vorstehenden Tabellen ergibt sich somit, daß im Dunkeln die Vermehrung ungefähr doppelt so rasch erfolgte als im Licht und daß auch Intensitätsunterschiede eine Veränderung in der Vermehrungsgeschwindigkeit zur Folge haben, wie die Beobachtung an Zellen zeigte, die in verschiedenen Entfernungen von der Lichtquelle aufgestellt wurden.

II. Der Einfluß der Spektralfarben auf die Sprossung.

Es war nun noch interessant, nachzusehen, welchen Spektralbezirken die hemmende Wirkung vornehmlich zukommt und ob Licht, das jenseits der menschlichen Wahrnehmung durch das Auge liegt, das ultraviolette und das ultrarote eine entsprechende Einwirkung auf die Zellvermehrung der Hefe ausübten.

Obwohl durch die Untersuchungen von Purvis und Warwik festgestellt wurde, daß die Sporenbildung durch die roten und gelben Strahlen gefördert, durch die blauen und violetten Strahlen gehemmt wird, so sind meines Wissens Angaben über den Einfluß farbigen Lichtes auf das Wachstum der Hefe in der Literatur nicht zu finden[1]).

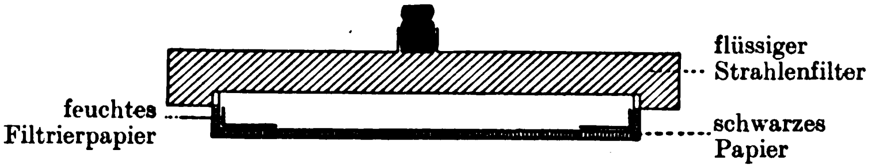


Fig. 1.

Ich betone ausdrücklich, daß die von mir in dieser Richtung aufgestellten Versuche nur einen beschränkten Wert haben, da ich bei den Mitteln, die mir zur Verfügung standen, die ungleichen Intensitäten bei den nach den Nagelschen Angaben hergestellten Strahlenfiltern nicht ausgleichen konnte[2]). Ein wissenschaftlich genaues Resultat würde sich natürlich nur dann ergeben, wenn die verschiedenen Strahlenfilter dieselbe Intensität hätten. Immerhin haben die Untersuchungen Resultate ergeben, die recht brauchbar sind und eine Beeinflussung der Vermehrungsgeschwindigkeit durch die Spektralfarben wahrscheinlich machen.

Für die Untersuchung erwiesen sich als sehr praktisch die von H. Baar[3]) verwendeten Keimschalen. Sie bestehen im wesentlichen aus einer Petrischale, deren doppelwandiger Deckel mit den flüssigen Strahlenfiltern gefüllt werden konnte. Ein Querschnitt durch eine solche Schale, welcher der Arbeit Baars entnommen ist, möge eine genauere Beschreibung ersetzen.

In diesen Schalen, die im Innern zum Teil mit feuchtem Filtrierpapier ausgekleidet waren, konnten die Präparate mit den markierten Zellen leicht untergebracht werden. Natürlich wurden die Strahlenfilter vor ihrer Verwendung genau spektroskopisch geprüft.

---

[1]) Purvis, J. E. u. Warwik, G. R., The influence of spectral colours on the sporulation of Saccharomyces. (Proceed. Cambridge Phil. Soc. Vol. 14. 1907. p. 30—40.)

[2]) Nagel, Wil. A., Über flüssige Strahlenfilter. (Biol. Centralbl. Bd. 18. 1898.) Ich verwendete folgende Strahlenfilter:
Rot: Lithionkarminlösung.
Orange: Wäßrige Safraninlösung + Kupferacetat.
Gelb: Wäßrige Safraninlösung + Kupferacetat + Orange G (von Dr. Grübler).
Grün: Kaliummonochromat + Cupramoniumsulfat.
Cyanblau: Methylgrün + Jodgrün + Kupferacetat + Gentianaviolett.
Blau und Violett: Cuprammoniumsulfat.

[3]) Baar, H., Über den Einfluß des Lichtes auf die Samenkeimung und seine Abhängigkeit von anderen Faktoren. (Sitzungsber. d. kais. Akad. d. Wissensch. Wien. Math.-naturw. Kl. Bd. 121. Abt. I. Juli 1912.)

Die Untersuchung erfolgte derart, daß die Kolonien, welche unter Einfluß der verschiedenen Spektralbezirke entstanden waren, mit den in der verdunkelten Schale entstandenen Kolonien verglichen wurden, deren Deckel mit Wasser gefüllt und auf der Unterseite mit schwarzem Papier verklebt war. Als Lichtquelle fand dieselbe elektrische Lampe Verwendung wie früher. Die Schalen mit den Präparaten wurden in gleichen Abständen von der Lichtquelle aufgestellt, so daß die Zellen von den Lichtstrahlen unter einem Winkel von 45° getroffen wurden und, wie ich mich überzeugte, überall die gleiche Temperatur herrschte.

Versuch 1.

Vom 5. X. 12 h. 30′ nachm. bis 6. X. 9 h. vorm.

Strahlenfilter	rot	orange	gelb	grün	blau und violett	dunkel
Zahl der	52	34	28	42	12	21
	41	32	22	28	16	33
entstandenen	53	18	59	30	8	34
	72	52	38	22	12	26
Zellen	38	30	31	22	12	32
	36			18		29
Mittelwert	48,6	33,2	35,6	27	12	29,1

Versuch 2.

Vom 6. X. 1 h. nachm. bis 7. X. 9 h. vorm.

Strahlenfilter	rot	orange	gelb	grün	blau und violett	dunkel
Zahl der	42	34	31	28	14	32
	33	25	27	21	13	18
entstandenen	32	32	29	23	17	30
	46	18	34	17	16	31
Zellen	41	24	24	16	12	16
Mittelwert	38,8	26,6	29	21	14,4	25,4

Diese 2 Versuche zeigen, daß unter den Strahlenfiltern mit verhältnismäßig großer Intensität, rot, orange, gelb weitaus größere Kolonien entstanden waren als unter den Filtern mit sehr schwacher Intensität (grün), blau und violett.

Hätten die Farben als solche gar keinen Einfluß, dann hätte auf Grund der Ergebnisse der Versuche über die Wirkung weißen Lichtes (s. p. 342) das Gegenteil eintreten müssen. Unter den Strahlenfiltern mit geringer Intensität hätte man die größeren, unter denjenigen mit großer Intensität die kleineren Kolonien erwartet.

Zur Überprüfung dieser Anschauung wurde die Wirkung der roten Strahlen direkt mit der der blauen und beide mit Dunkelwirkung verglichen, da gerade unter diesen Filtern die größten bzw. die kleinsten Kolonien entstanden waren. So konnte in jedem Fall eine größere Zellenzahl zur Beobachtung gelangen.

Versuchsdatum	Versuchsdauer in Stunden	Zahl der entstandenen Zellen (Mittelwert)		
		Rot	Blau	Dunkel
7.—8. X.	18½	38	15,3	27
10.—11. XI.	16¼	17	9	12
13.—14. XI.	16	22	12	18,6
14.—15. XI.	17¾	34	14,2	35,7
18.—19. XI.	18	18,5	8	19

Die Versuche bestätigen, daß mit Sicherheit die blauen und violetten Strahlen gegenüber Dunkelheit die Zellsprossung hemmen. Unter Einwirkung der roten Strahlen waren mit Einschluß der 2 Vorversuche in 5 Fällen größere, in 2 Fällen kleinere Kolonien entstanden, es kann daher nur vermutet werden, daß im roten Licht die Zellvermehrung lebhafter vor sich geht als im Dunkeln. In welchem Verhältnis die Wirkung der blauen zu der der roten Strahlen steht, geht aus den Versuchen nicht hervor, denn der retardierende Einfluß des blauen und violetten Lichtes würde jedenfalls noch viel größer sein, wenn die Intensität dieses Filters nicht so gering wäre. Ebenso bleibt die Frage dahingestellt, ob die blauen Strahlen die Vermehrung mehr hemmen als das weiße Licht, da die Intensität des blauen Filters und die Intensität der Lichtquelle nach Passieren einer mit Wasser gefüllten Schale nicht verglichen werden kann.

III. Versuche mit ultraviolettem Licht.

Durch die Untersuchungen vieler Forscher, namentlich durch die Hertels, ist gezeigt worden, daß die Mikroorganismen sowohl der Tier- als auch der Pflanzenwelt durch die ultravioletten Strahlen bei längerer Einwirkung getötet, bei kürzerer geschädigt werden und auch für die Phanerogamen ist die schädigende Wirkung dieser Strahlen von Stoklasa, Klüyer und anderen dargetan worden[1]).

Wenn auch über den Einfluß des ultravioletten Lichtes auf die Hefe meines Wissens keine Angaben existieren, so konnte auf Grund der bisherigen Erfahrungen nicht daran gezweifelt werden, daß auch dieser Organismus von Strahlen der Wellenlänge 280 $\mu\mu$ schädigend beeinflußt werden dürfte und daß auch seine Vermehrung bei kürzerer Beleuchtung gehemmt, bei längerer, mit Eintritt des Todes, vollkommen sistiert werden dürfte.

Immerhin schien es nicht uninteressant zu sein, die Beziehungen des ultravioletten Lichtes zur Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe genauer zu verfolgen.

Für die Untersuchungen verwendete ich eine Quecksilberdampfquarzlampe der Firma Heraeus, welche in einem Dunkelkasten untergebracht war[2]). Auf dem Boden des Kastens, genau unter dem Quarzrohr der Lampe, von diesem 36 cm entfernt, wurden die Präparate der Lichtquelle ausgesetzt, so daß die markierten Zellen von den Lichtstrahlen senkrecht getroffen wurden.

---

[1]) Hertel, E., Über die Beeinflussung des Organismus durch Licht, speziell durch die chemisch wirksamen Strahlen. (Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 4. 1904); Über physiologische Wirkung von Strahlen verschiedener Wellenlänge. (Ebenda. Bd. 5. 1905); Über die Einwirkung von Lichtstrahlen auf den Zellteilungsprozeß. (Ebenda. Bd. 5. 1905.)

Stoklasa, J., Über den Einfluß der ultravioletten Strahlen auf die Vegetation. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 30. 1911. p. 422.)

Kluyver, A. J., Über die Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf die höhere Pflanze. (Sitzber. d. Akad. d. Wiss. Wien. Math.-naturw. Kl. Bd. 120. Abt. I. 1911.)

Reihenfolge der Versuche	Beginn		Ende		Beleuchtungsdauer		Zahl der entstandenen Zellen
	Tag	Stunde	Tag	Stunde	Min.	Sek.	
1	1914 12. I.	4 h. nachm.	13. I.	3 h. nachm.	—	—	43, 42, 39, 42, 41, 46, 52, 43, 46, 45, 45
					30	—	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
					15	—	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
2	13. I.	4 h. nachm.	14. I.	3 h. nachm.	—	—	40, 48, 47, 42, 44, 44, 36, 43, 47, 46
					10	—	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
					5	—	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
3	15. I.	4 h. nachm.	16. I.	8 h. vorm.	—	—	7, 7, 6, 6, 8, 8, 7, 8, 7, 8
					1	—	2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2, 2
					—	30	2, 2, 2, 2, 2, 3, 3, 2, 2, 3
3	„		16. I.	3 h. nachm.	—	—	25, 25, 26, 25, 25, 24, 25, 24, 24, 24
					1	—	5, 5, 4, 5, 5, 6, 5, 5, 5, 5
					—	30	7, 6, 5, 6, 7, 9, 9, 10, 7, 7
4	20. I.	4 h. nachm.	21. I.	8 h. vorm.	—	—	7, 8, 6, 5, 8, 8, 7, 8
					—	20	3, 4, 3, 3, 3, 4, 3, 4
					—	10	7, 5, 5, 5, 4, 4, 5, 5
4	„		21. I.	3 h. nachm.	—	—	20, 21, 16, 15, 21, 22, 20, 20
					—	20	8, 9, 7, 8, 8, 8, 8, 8
					—	10	17, 14, 14, 15, 13, 15, 14, 14
5	25. I.	4 h. nachm.	26. I.	8 h. vorm.	—	—	7, 4, 7, 8, 7, 7, 7, 7, 8, 8
					1	30	1, 2, 2, 2, 2, 1, 2, 3, 2, 2
					2	—	2, 2, 2, 2, 2, 1, 2, 2, 2, 2
5	„		26. I.	3 h. nachm.	—	—	15, 16, 18, 16, 16, 21, 21, 16, 18, 18
					1	30	1, 2, 2, 2, 2, 1, 3, 4, 3, 3
					2	—	2, 2, 2, 4, 2, 1, 2, 2, 2, 2
6	27. I.	4 h. nachm.	28. I.	8 h. vorm.	—	—	8, 8, 7, 8, 7, 9, 8, 8, 8, 8
					2	30	1, 1, 1, 2, 1, 1, 1, 1, 1, 1
					3	—	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1
6	„		28. I.	3 h. nachm.	—	—	42, 42, 43, 36, 41, 44, 41, 42, 42, 45
					2	30	2, 1, 1, 2, 1, 2, 2, 2, 2, 2
					3	—	1, 1, 2, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1
6	„		29. I.	3 h. nachm.	—	—	Infolge der Größe der Kolonien war ein Zählen der Zellen unmöglich
					2	30	2, 1, 1, 2, 1, 2, 2, 2, 2, 2
					3	—	1, 1, 2, 2, 2, 1, 2, 1, 1, 1
7	29. I.	4 h. nachm.	31. I.	11 h. vorm.	—	—	Infolge der Größe der Kolonien war ein Zählen der Zellen unmöglich
					3	30	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1,
					4	—	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

---

[2]) Bei den Versuchen mit der Quecksilberdampfquarzlampe betrug die Netzspannung 100 Volt, die Stromstärke 3½ Ampère.

Natürlich konnten bei den Präparaten, die im übrigen genau so hergestellt waren wie in den früheren Versuchen, die gewöhnlichen Deckgläser nicht verwendet werden, da diese Strahlen von der Wellenlänge 280 $\mu\mu$ nicht durchlassen [Klüyer][1]. Mit Ausnahme desjenigen Präparates, dessen Zellen von den ultravioletten Strahlen nicht getroffen werden sollten, kamen daher Quarzdeckgläser von gleicher Stärke zur Verwendung. So konnten auch diese Zellen während der Expositionszeit im Dunkelkasten denselben Bedingungen ausgesetzt werden. Die Beobachtung erfolgte meist zu zwei verschiedenen Zeiten mit dem Okular 4 und dem Objektiv 3 nach Reichert, da die stärkeren Objektive wegen der Dicke der Quarzdeckgläser nicht verwendet werden konnten.

Der größeren Übersichtlichkeit wegen seien die Versuche in einer Tabelle zusammengefaßt (s. p. 348).

Aus der vorstehenden Tabelle ist zu ersehen, daß schon die geringe Beleuchtungszeit von 10 Sekunden genügte, um eine merkliche Verzögerung in der Vermehrungsgeschwindigkeit hervorzurufen, wirkten die Strahlen 30 Sekunden auf die Zellen ein, so war der retardierende Einfluß schon sehr stark ausgeprägt und nach 2—3 Minuten andauernder Beleuchtung besaßen die Zellen gerade nur noch die Kraft, um eine Tochterzelle zu bilden, waren aber unfähig, sich weiter zu vermehren. Wurde die Hefe länger als 3 Minuten der Wirkung der ultravioletten Strahlen ausgesetzt, so trat der Tod der Zelle ein, indem sie sich, auch wenn sie 3 oder 4 Tage unter günstigen Ernährungsbedingungen gelassen wurden, nicht vermehrten.

IV. Versuche mit ultrarotem Licht.

War die Einwirkung mit ultravioletten Strahlen auf die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe sehr scharf ausgeprägt, so hatten die Strahlen, die jenseits des Rot liegen und durch das menschliche Auge nicht mehr wahrgenommen werden, wie die nächsten Versuche zeigen, der vollkommenen Dunkelheit gegenüber die Zellsprossung nicht wesentlich beeinflußt. Die Zellen befanden sich unter Senebierschen Glocken, wovon die eine mit einer Lösung von Jod in Schwefelkohlenstoff, die andere mit Leitungswasser gefüllt und überdies mit einem Zinnsturz überdeckt war. Unter der erstgenannten Glocke waren nur Wärmestrahlen, in welcher aber die ultraroten Strahlen dominierten, vorhanden. Ein Austrocknen der Präparate wurde durch die teilweise Auskleidung der Innenwände der Glocken, sowie durch Wasserabschluß derselben verhütet. Die Lichtquelle war dieselbe wie die in den Versuchen mit weißem Licht.

---

[1] Meine ersten Versuche nach dieser Richtung mit offenen Tröpfchen gaben gar kein Resultat, da die Tröpfchen zu rasch abdampften. Später ließ ich in flachen Schalen entsprechende Mengen Hefe-Würzesuspension dem Einfluß der ultravioletten Strahlen aussetzen und verwendete sie dann zur Herstellung der Tröpfchen auf gewöhnlichen Deckgläsern. Trotz der großen Sorgfalt bei der Übertragung der Zellen waren auch die Resultate dieser Versuche nicht befriedigend, da die Einzelzählungen sehr unregelmäßig waren, so daß man annehmen mußte, daß Zellen, die durch andere gegen die Lichtquelle gedeckt waren, von diesen Strahlen überhaupt nicht oder nur wenig geschädigt wurden. Wenn diese Anschauung richtig ist, dann hätte man es mit einer interessanten Analogie zu den Versuchen mit höheren Pflanzen zu tun, bei welchen nach Kluyver die Epidermis in den meisten Fällen die ultravioletten Strahlen vollkommen absorbiert und die darunter liegenden Gewebe schützt. Die Verwendung von Quarzdeckgläsern ist daher unbedingt notwendig.

Eine Übersicht über die Versuche gibt die folgende Tabelle.

Versuchsdatum 1914	Versuchsdauer	Temperaturen (Celsius)				Zahl der entstandenen Zellen (Mittelwert	
		Ultrarot		Dunkel			
		höchste	niederste	höchste	niederste	Ultrarot	Dunkel
9.—10. I.	16	15	14,5	14,5	14,5	6,1	5,27
10.—11. I.	16½	16	15	15,5	15	10,17	8
11.—12. I.	16	15	14,5	14,75	14,5	7,86	7 21

Ein Blick auf die Tabelle lehrt, daß die Kolonieentwicklung im Ultrarot bzw. im Wärmeanteil des Spektrums überhaupt mit nahezu gleicher Lebhaftigkeit vor sich ging als im Dunkeln. Die geringen Unterschiede dürften darauf zurückzuführen sein, daß die Temperatur unter der Glocke mit Jod in Schwefelkohlenstoff die der verdunkelten Glocke durchschnittlich um ½° Celsius übertraf.

Am Schlusse meiner Arbeit sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Molisch, für die zahlreichen Anleitungen und Ratschläge sowie für das rege Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegenbrachte, den herzlichsten Dank auszusprechen. Ebenso bin ich Herrn Professor Dr. O. Richter für die liebenswürdige Unterstützung und die mühsame Arbeit der Kontrolle, sowie Herrn Professor Dr. H. Zikes dafür, daß er Kontrollversuche anstellte und mir die Reinkulturen zur Verfügung stellte, zu überaus großem Dank verpflichtet.

V. Zusammenfassung.

1. Kny und Lohmann, die sich zuerst mit dem Einfluß weißen Lichtes auf die Sprossung der Hefe beschäftigt hatten, haben mittels der alten Zählmethode gefunden, daß diffuses Tageslicht bzw. Licht von geringer Intensität keinen wesentlichen Einfluß auf die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe ausübt. Meine mit markierten Einzellkulturen angestellten Versuche ergaben, daß diffuses Tageslicht die Zellvermehrung von Saccharomyces cerevisiae hemmt, indem sich die unbeleuchteten Zellen ungefähr doppelt so rasch vermehren als die belichteten.

2. Dieselbe Wirkung hat das elektrische Licht. Sie ändert sich nicht, wenn statt der flüssigen Bierwürze ein festes Würzeagar als Nährmedium dient.

3. Ähnlich wie Saccharomyces cerevisiae verhält sich Saccharomyces Ludwigii.

4. Auch verschiedene Unterschiede in der Lichtintensität wirken auf die Geschwindigkeit der Hefesprossung. Werden die Zellen in verschiedene Entfernungen von der Lichtquelle gebracht, so zeigen die am weitesten entfernten die rascheste Vermehrung.

5. Bezüglich der Spektralfarben kann mit Sicherheit gesagt werden, daß das blaue Licht die Vermehrung dem Dunkel gegenüber verzögert, ferner daß im roten Licht die Vermehrung mit gleicher, vielleicht mit noch größerer Ge-

schwindigkeit vor sich geht. Weitere Beziehungen der Spektralfarben untereinander und zu weißem Licht konnten nicht festgestellt werden, da die verwendeten Strahlenfilter ungleiche Intensitäten hatten.

6. Die ultravioletten Strahlen hemmen schon bei der minimalen Wirkungsdauer von 10 Sekunden die Vermehrung, bei länger als 3 Minuten dauernder Beleuchtung werden die Zellen getötet.

7. Im Wärmespektrum, in welchem die ultraroten Strahlen dominieren, findet die Vermehrung mit gleicher Lebhaftigkeit statt wie im Dunkeln.

Nachdruck verboten.

Einige japanische Schimmelpilze.

II. Mitteilung.

Über die Aspergillusarten aus „Katsuobushi“ und Vergleichung von vier A. ochraceusartigen Pilzen.

[Aus dem Techn. Institut der Kaiserl. Universität zu Tokio.]

Von **G. Kita.**

„Katsuobushi“ ist getrocknetes Bonitofleisch (Gymnosarda affinis), das allgemein in Japan als Genußmittel zur Zubereitung von Suppe, Sauce und beim Kochen mit Soja zusammen Anwendung findet. Die Produktion ist so enorm, daß sie etwa ein Fünftel der gesamten japanischen Meeresproduktion beträgt.

Der Fisch, der meistens vom April bis zum Oktober gefangen wird, wird seiner Länge nach in zwei oder vier Teile geschnitten, gekocht und getrocknet, und zwar anfangs auf glühenden Kohlen, dann in der Sonne bis zu etwa 10 Proz. Wassergehalt.

Der auf solche Weise ziemlich gut getrocknete Bonito wird in irgendein Faß oder dergl. geschichtet und längere Zeit stehen gelassen, während welcher Zeit der Schimmel allmählich zum Vorschein kommt.

Wenn die Verschimmelung die geeignete Stufe erreicht hat (wozu gewöhnlich 9—13 Tage nötig sind), wird der Bonito herausgenommen, in der Sonne getrocknet und der Schimmel sauber abgebürstet. Das Verpacken, die Verschimmelung (wozu immer längere Zeit erforderlich wird) und das Abbürsten wird wiederholt, um ihn völlig zu trocknen und dauerhaft zu machen.

Bei der Verschimmelung kommen verschiedene, aber meist zu Aspergillus gehörige Pilze vor. Eine blaue Decke liefert ein Erzeugnis von guter Qualität, während andere, bunt gefärbte minderwertig sind, was vermutlich von der Vorbehandlung, besonders dem Trocknungsgrad und der Zusammensetzung des Fleisches abhängt.

Im Jahre 1911 wurden 2 eingehende Mitteilungen über die Schimmelpilze dieses Fisches veröffentlicht, worin M. Yukawa[1]) 2 neue Aspergillusarten, A. melleus und A. gymnosardae, als regelmäßig auftretende Arten angibt und als Erreger des grünen Rasens betrachtet,

---

[1]) Journ. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokio. Vol. 1. p. 378.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

während J. Hanzawa[1]) den A. glaucus als eine wichtige Art bezeichnet.

Weiter sind angegeben worden: A. albus, Verticillium glaucum, Penicillium glaucum, Mucor racemosus (nach Yukawa), A. flavo-viridescens Hanzawa, Cladosporium herbarum, Catenularia fuliginea, A. ochraceus (nach Hanzawa), die aber ohne Nutzen sind.

Yukawas A. gymnosardae erinnert in jeder Beziehung an A. glaucus, das Fehlen der Perithecienbildungsfähigkeit ausgenommen. A. melleus, der eine für die Katsuobushibereitung ungünstige Art ist, verflüssigt jedoch Nährgelatine kräftig, was auch ein charakteristisches Merkmal von A. ochraceus ist und eine technische Verwendung desselben verspricht.

Der Zweck meiner Untersuchung der Pilze des Katsuobushi ist nicht der, die früheren Arbeiten zu kritisieren und den Vorgang des Werdens des Katsuobushi zu untersuchen, sondern irgendeinen Pilz, der eine stärkere proteolytische Kraft hat, wie A. melleus, zu isolieren und bei der Sojabereitung anzuwenden.

Von verschiedenen Proben in bezug auf Alter und Bereitungsort wurden in der üblichen Weise durch Plattenkultur auf Kojigelatine oder auf Brot 5 Aspergillusarten isoliert und in Reinkulturen auf ihre näheren Eigenschaften hin untersucht. Es sind dies A. glaucus, A. Wentii, A. sulfureus var., A. oryzae und A. albus. Darunter ist A. glaucus die wichtigste Art, und es gibt davon wahrscheinlich sehr viele Varietäten; so bildet eine Art, die aus einer guten Probe isoliert wurde, schwer gelbe Perithecien, selbst auf Kojigelatine und in der Lösungskultur, während andere Arten auf Bonitofleisch leicht Perithecien bilden und eine bunt gefärbte Decke ergeben.

Unter allen diesen Pilzen ist A. Wentii technisch wichtig. Unser A. sulfureus zeichnet sich durch eine besondere Art Sklerotienbildung aus, die einer früheren Beschreibung nicht entspricht, aus welchem Grunde ich über beide Pilze Näheres mitteilen will.

Nicht in Verbindung mit der Katsuobushibereitung, aber bei der Sojabereitung zur Anwendung kommend, steht ein dem A. ochraceus ähnlicher Pilz, der „Onikipilz“, der auch eine charakteristische, starke, die Sojabohnen spaltende Kraft haben dürfte. Ihn mit den schon bekannten, ihm nahestehenden Arten zu vergleichen und seine Stellung im System zu bestimmen, ist von Interesse.

I. Beschreibung von zwei Aspergillusarten.

Aspergillus Wentii Wehmer.

Diese von Wehmer näher beschriebene Art ist bekannt als ein wichtiger Pilz, der bei Lockerung und Aufschließung der Sojabohnen bei der Sojaherstellung auf Java eine Rolle spielt. Es ist ein hoher Konidienträger und bildet emporsteigende Luftmycelien. Die Farbe der Decke ist hellkaffeebraun; dazwischen treten junge, gelbe Köpfchen auf. Auf allen untersuchten Nährböden[2]) war das Wachstum sehr gut. (Das Wachstum der Probe, die ich vom Wehmerschen Laboratorium durch Herrn Prof. Usami bekam, war nur schwach verändert.) Die Sterigmen sind im allgemeinen unverzweigt, aber es kommen auch verzweigte Sterigmen vor, wo die sekundären so kurz sind, daß sie sich von den Konidien unterscheiden lassen. Die Perithecienbildung wurde mit besonderer Aufmerksamkeit auf verschiedenen Nährböden unter abweichenden Bedingungen untersucht, der Erfolg war jedoch negativ. Wie die beiliegenden vergleichenden Versuche zeigen, spaltet der Pilz nicht besonders kräftig Proteïn.

---

[1]) Journ. Coll. Agric. Tohoku Imp. Univ. Sapporo. Vol. 4. p. 216.

[2]) Brot, Reis, Kartoffel, Kleien, Bohnen, Kojigelatine, Kojidekokt, Würze, Kunstnährlösung mit 0,25 g $MgSO_4Ag$, 5 g KH_2PO_4, 50 g Kohlenhydrat, 5 g Stickstoff-

Aspergillus sulfureus var.

Der Pilz wurde mit anderen Aspergillusarten zusammen von lange in einer feuchten Kammer aufbewahrtem Bonit isoliert. Der Rasen ist hellschwefelgelb und verfärbt sich nach längerer Zeit ins schmutzig Gelbliche. Der Konidienträger ist ziemlich stattlich, nicht septiert, mit glatter oder stacheliger Wand. Die Blase ist kuglig oder etwas ellipsoidisch, scharf abgesetzt von dem Stiel und allseitig mit radiär ausstrahlenden, leicht wahrnehmbaren, verzweigten Sterigmen besetzt. Diese sind kegelförmig und mit je 3—5 langen, spulenförmigen, sekundären Sterigmen besetzt. Die Konidienketten sind sehr lang und gehen vom Stiel sternförmig aus. Die Konidien sind meist kugelig mit feinen Stacheln. Kolbenförmige Blasen mit einfachen Sterigmen kamen auch manchmal vor, besonders bei wiederholten Kulturen auf Kojiagar. Sklerotien wurden auf nasser Kleienkultur beobachtet, abweichend von früherer Beschreibung. Sie sind kugelig, ellipsoidisch und gelb gefärbt, aber werden mit der Zeit orangegelb. Askusbildung ist noch nicht bekannt. In verschiedenen Kunstnährlösungen entwickeln sich die submersen Mycelien verhältnismäßig gut, aber der Konidienträger ist nicht so stattlich wie auf festen Nährböden. Selbst in alten Kulturen wurden keine Sklerotien bemerkt.

Wie obige Beschreibungen und nachstehende Dimensionen zeigen, weicht diese Art etwas von A. sulfureus ab. Aber ich glaube, daß es zweckmäßig ist, sie als eine Varietät des A. sulfureus zu betrachten.

II. Vergleichende Versuche mit den Aspergillusarten aus „Katsuobushi".

1. Reiskultur.

25 g Reis wurden mit 15 ccm Wasser im 400 ccm fassenden Erlenmeyerkolben gedämpft, mit den betreffenden Konidien geimpft und bei 30° C aufbewahrt.

	Nach	
	1 Tage	12 Tagen
1. A. glaucus[1])	—	—
2. Weiße Aspergillusart[1])	spärlich	weiße Decke } beide ähnlich
3. A. candidus	„	„ „
4. A. Wentii[1])	—	kaffeebraun
5. A. sulfureus var.[1])	etwas	hellgelb
6. A. oryzae[1])	weiße Mycelien	grüne Decke
7. A. oryzae (Ul)	„	„
8. A. tamarii	„	teebraun
9. A. ochraceus	—	ockergelb
10. Rh. Delemar	etwas	schwarze, hohe Mycelien

Nach 12-tägiger Kultur wurden 100 ccm Wasser zugesetzt und nach 17 Stunden filtriert.

---

verbindung und einigen Tropfen $FeCl_3$-Lösung in 1000 ccm Leitungswasser (Kohlehydrat: Glukose, Maltose, Sukrose, Laktose, Stärke, N-Verbindung: $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, KNO_3, Pepton).

[1]) Aus Katsuobushi.

Filtrat.

	$FeCl_3$-Reaktion	Azidität ccm N/10-Lauge f. 10 ccm Lösung	Zuckermenge ccm Lösung f. 20 ccm Fehlingscher Lösung
1	—	—	—
2	rot	0,7	17,2
3	„	1,0	16,8
4	—	1,5	1,6
5	rot	1,0	9,5
6	„	3,8	5,1
7	„	11,0	1,3
8	„	3,0	2,4
9	—	0,5	7,4
10	—	3,1	16,8

	Diastatische Kraft 100 ccm 2-proz. lösl. Stärkelösung + 10 ccm Filtrat bei 55° C Einwirkungsdauer				Gelatineverflüssigungs-Kraft 10 ccm 10-proz. Gelatinesäule + 10 ccm Filtrat 24. Dez. bis	
	20 Min.	1 Std.	2,5 Std.	2,5 Std.		
	Jodreaktion			ccm Lösung f. 20 ccm Fehlingscher Lösung	16. Jan.	31. Jan.
1	—	—	—	—	—	—
2	blau	blau-purpur	blau-purpur	28,0	1,4	2,0
3	„	„	„	22,0	1,4	2,0
4	gelb	—	—	5,8	0,9	1,2
5	blau	blau	blau-purpur	18,4	0,8	1,2
6	purpur	gelb	—	8,5	1,6	2,2
7	rot	—	—	4,9	2,0	2,8
8	purpur	gelbrot	gelbrot	6,6	1,9	2,6
9	blau	blau	purpur	32,7	1,8	2,4
10	„	rot	—	7,0	1,2	1,6

2. Reiskleienkultur.

10 g Reiskleie + 10 ccm Wasser, 7 Tage bei 17—20° C. 100 ccm Wasser zugesetzt und nach 17 Stunden filtriert.

	Filtrat		Gelatineverflüssigungs-Kraft
	Azidität ccm N/10-Lauge f. 10 ccm Lösung	$FeCl_3$-Reaktion	10 ccm 10-proz. Gelatinesäule + 10 ccm Filtrat 17. Jan. bis 31. Jan.
1. Weiße Aspergillusart[1])	2,8	—	4,5
2. A. candidus . . .	2,2	—	4,5
3. A. Wentii[1])	5,0	—	2,5
4. A. sulfureus var.[1])	2,0	—	4,5
5. A. oryzae[1])	3,3	—	4,5
6. A. oryzae (Ul) . .	1,2	—	4,5
7. A. tamarii	4,5	rot	4,7
8. Rh. Delemar . . .	3,6	—	1,5

---

[1]) Aus Katsuobushi.

Diastatische Kraft.
100 ccm 2-proz. lösl. Stärkelösung + 10 ccm Filtrat bei 50° C.

	Jodreaktion		ccm Lösung für 20 ccm Fehling scher Lösung
	Einwirkungsdauer		
	0,5 Std.	1,5 Std.	1,5 Std.
1	purpur	rot	24,2
2	,,	,,	23,0
3	,,	—	10,8
4	,,	purpurrot	16,6
5	gelb	—	13,0
6	,,	—	13,0
7	rot	—	11,2
8	purpur	—	11,0

3. Kleienkultur.

10 g Kleie + 10 g Wasser, 7 Tage bei 17—20° C. 100 ccm Wasser zugesetzt und nach 17 Stunden filtriert.

	Filtrat		Gelatineverflüssigungs-Kraft
	Azidität ccm N/10-Lauge f. 10 ccm Lösung	$FlCl_3$-Reaktion	10 ccm 10-proz. Gelatinesäule + 10 ccm Filtrat 17.—31. Jan.
1. Weiße Aspergillusart[1])	1,7	—	4,5
2. A. candidus . . .	1,6	—	4,0
3. A. Wentii[1])	3,3	—	3,0
4. A. sulfureus var.[1]) .	2,0	—	4,5
5. A. oryzae[1])	2,8	—	4,0
6. A. oryzae (Ul) . .	1,8	—	4,5
7. A. tamarii	3,9	rot	4,5
8. Rh. Delemar . . .	1,2	—	1,0

Diastatische Kraft.
100 ccm 2-proz. lösl. Stärkelösung + 10 ccm Filtrat bei 50° C.

	Jodreaktion		ccm Lösung für 20 ccm Fehling scher Lösung
	Einwirkungsdauer		
	0,5 Std.	1,5 Std.	1,5 Std.
1	purpur	gelb	11,5
2	,,	,,	10,9
3	,,	,,	9,8
4	,,	rot	11,4
5	gelb	—	8,8
6	,,	—	8,6
7	gelbrot	—	7,5
8	purpur	gelb	10,7

---

[1]) Aus Katsuobushi.

4. Bohnenmehlkultur.

10 g entfettetes Sojabohnenmehl + 10 g Wasser, 8 Tage bei 22—25° C.

100 ccm Wasser zugesetzt und nach 17 Stunden filtriert. Der Rückstand wurde gut gewaschen und nach Kjeldahl die N-Menge bestimmt.

	Enzymfiltrat		Rückstand	Gelatineverflüssigungs-Kraft 10 ccm 10-proz. Gelatinesäule + 10 ccm Filtrat 26. Dez. bis	
	N-Menge in 25 ccm	Azidität ccm N/10-Lauge f. 10 ccm Lösung	N-Menge	16. Jan.	31. Jan.
1. Weiße Aspergillusart[1]	0,0980	2,0	0,1244	5,5	6,5
2. A. candidus	0,1092	2,0	0,1190	5,0	6,5
3. A. Wentii[1]	0,1016	3,2	0,1792	5,0	6,5
4. A. sulfureus var.[1]	0,0980	3,4	0,1330	6,0	7,0
5. A. oryzae[1]	0,0994	1,8	0,1148	5,5	7,0
6. A. oryzae (9$_2$)	0,1246	1,8	0,0860	5,5	7,0
7. A. tamarii	0,0854	2,0	0,1344	6,5	7,0
8. A. ochraceus	0,0868	1,4	0,1428	5,0	6,5
9. Kontrolle	0,0014	2,4	0,6076	—	—

Diastatische Kraft. 100 ccm 2-proz. lösl. Stärkelösung + 5 ccm Filtrat bei 55° C.

	Jodreaktion				ccm Lösung für 25 ccm Fehlingscher Lösung
	Einwirkungsdauer				
	30 Min.	1 Std.	2 Std.	3,5 Std.	3,5 Std.
1	blau	blau	blau	blau	86,0
2	„	„	blaupurpur	purpur	57,0
3	purpur	purpur	rot	rot	10,5
4	blau	blau	blau	blau	55,0
5	purpur	rot	gelb	rot	14,0
6	rot	purpur	rotpurpur	rotpurpur	16,6
7	purpur	rotpurpur	gelbrot	gelbrot	15,5
8	blau	blau	blaupurpur	blaupurpur	62,0

5. Bohnenmehlkultur.

10 g entfettetes Sojabohnenmehl + 10 g Wasser, 8 Tage bei 25—27° C. 100 ccm Wasser zugesetzt und nach 17 Stunden filtriert.

	Filtrat Azidität ccm N/10-Lauge f. 10 ccm Lösung	Rückstand Gesamt-N-Menge	Gelatineverflüssigungs-Kraft 10 ccm 10-proz. Gelatinesäule + 10 ccm Filtrat 28. Febr. bis	
			20. März	29. März
1. A. Wentii[1]	3,0	0,2982	2,3	3,0
2. A. oryzae[1]	2,2	0,1862	2,3	3,0
3. A. oryzae (Ul)	1,6	0,1540	2,8	3,8
4. A. tamarii	2,6	0,1470	3,1	4,0
5. Oid. lupli	1,6	0,3500	1,0	1,6

---

[1] Aus Katsuobushi.

Diastatische Kraft.

100 ccm 2-proz. lösl. Stärkelösung + 10 ccm Filtrat bei 50° C.

	Jodreaktion				ccm Lösung für 20 ccm Fehlingscher Lösung
	Einwirkungsdauer				
	10 Min.	20 Min.	1 Std.	1,5 Std.	2 Std.
1	blau	blau-purpur	purpur	purpur	16,0
2	rot	rot	gelb	—	13,0
3	rot	gelbrot	gelb	—	13,6
4	blau	purpur	purpur	rotgelb	22,3
5	blau	blau	blau	blau	30,7

6. Bohnenmehlkultur.

10 g entfettetes Sojabohnenmehl + 10 g Wasser, 15 Tage bei 22—25° C. 100 ccm Wasser zugesetzt und nach 17 Stunden filtriert.

	Filtrat Azidität ccm N/10-Lauge f. 10 ccm Lösung	Rückstand Gesamt-N-Menge	Gelatineverflüssigungs-Kraft
1. A. Wentii[1])	5,3	0,1540	4,0
2. A. oryzae[1])	1,8	0,0784	3,3
3. A. tamarii	2,4	0,1246	4,2
4. A. melleus	3,6	0,0883	4,6
5. A. ochraceus . . .	2,1	0,2072	3,8

Diastatische Kraft.

100 ccm 2-proz. Stärkelösung + 5 ccm Filtrat bei 50° C.

	Jodreaktion			ccm Lösung für 20 ccm Fehlingscher Lösung	
	Einwirkungsdauer				
	0,5 Std.	1 Std.	2 Std.	0,5 Std.	4 Std.
1	purpur	rotpurpur	gelbrot	36,5	16,2
2	rotpurpur	schwach gelb	schwach gelb	16,8	12,8
3	rot	rot	gelbrot	38,0	13,2
4	blau	blaupurpur	dunkel-purpur	80,0	12,5
5	„	blau	„	über 80,0	über 40,0

---

[1]) Aus Katsuobushi.

Temperaturoptimum für das Wachstum.

Nährboden: Kojidekoktagar. — Januar.

	Zimmertemperatur				15—17°				27°				35—37°			
Kulturdauer (Tag):	1	5	7	9	1	5	7	9	1	5	7	9	1	5	7	9
1. A. glaucus[1]	—	—	—	—	—	++	+++	+++	—	+++	+++	+++	—	—	—	—
2. Weiße Aspergillusart[1]	—	—	—	—	—	++	+++	+++	etwas	+++	+++	+++	—	+	++	++
3. A. Wentii[1]	—	—	—	—	—	++	+++	+++	„	+++	+++	+++	—	—	—	—
4. A. sulfureus var.[1]	—	—	—	—	—	++	+++	+++	„	+++	+++	+++	—	—	—	—
5. A. oryzae[1]	—	—	—	—	—	++	+++	+++	„	+++	+++	+++	—	+	+	+

+	Rasen etwas entwickelt ohne Konidien.
++	„ mit Konidien, aber nicht reichlich.
+++	„ „ reichen Konidien.

Dimensionen.

	A. glaucus[1]		A. Wentii[1]		A. sulfureus var.[1]		Weiße Aspergillusart[1]
Nährboden:	Katsuobushi	Kojigelatine	Reiskleie	Kojigelatine	Reiskleie	Kojigelatine	Kojigelatine
Konidienträger	0,46—0,7 mm	0,35—0,6 mm	1,0—1,6 mm	—3 mm	0,46—1,0 mm	0,46—1,0 mm	0,46—1,5 mm
Stieldicke	7—12 μ	5—14 μ	8—14 μ	10—23 μ	4,6—9,0 μ	5,0—12,0 μ	4,6—12 μ
Stielwanddicke	1,2 μ	1,2 μ	1,2—2,3 μ	2—3,6 μ	1,0—1,8 μ	1,2 μ	1,0—1,8 μ
Köpfchendurchmesser	0,04—0,11 mm	—	0,1—0,23 mm	0,16—0,46 mm	0,1—0,2 mm	0,045—0,19 mm	0,045—0,12 mm
Blasendurchmesser	—23 × 35 μ	12 × 20—23 × 30	23—35 μ	—100 μ	20—46 μ	20—70 μ	8—30 μ
Sterigmen	7,0—9,0 μ	5—9 μ	—	4,0—8,0 μ	—	prim. 10 × 4—15 × 7 sek. 7 × 3— 9 × 5	6—8 μ einfach
Konidien	4,6—7,0 μ	4,6—10,0 μ	2,3—4,6 μ	2,3—4,0 μ	2,0—4,6 μ Sklerotien 0,7—1,0 mm	2,0—3,0 μ	3—4 μ

---

[1] Aus Katsuobushi.

7. Stärkelösungskultur,

100 ccm 5-proz. Stärkelösung in Erlenmeyerkolben wurden mit den betreffenden Konidien geimpft und bei 25° C aufbewahrt.

	Wachstumsverhältnis		Verflüssigungsverhältnis
	Kulturdauer		
	4 Tage	9 Tage	17 Tage
1. Weiße Aspergillusart[1])	weiße Decke inselförmig	Decke mit Konidien vollkommen	am besten, mit Jod schwach gelb
2. A. sulfureus var.[1]) .	gelbe Decke inselförmig	Decke vollkommen gelb	schlecht
3. A. Wentii[1])	weiße Decke vollkommen	Decke vollkommen wattenartig, ohne Konidien	schlecht
4. A. oryzae[1])	weiße Decke beinahe vollkommen	Decke vollkommen schmutzig-grün	schlecht
5. A. oryzae (Ul) . .	Decke mit Konidien vollkommen	„	etwas verflüssigt
6. A. ochraceus . . .	wenig entwickelt	Decke vollkommen eigelb	schlecht
7. Rh. Delemar . . .	Mycelien 3 cm hoch	Mycelien 3 cm hoch	schlecht

	ccm Lösung für 20 ccm Fehlingscher Lösung		Jod-Reaktion	ccm N/10 für 10 ccm Lösung	Pilzernte in g
	Kulturdauer				
	17 Tage	39 Tage	39 Tage	39 Tage	39 Tage
1	11,0	Zucker spärlich	—	5,0	0,8
2	10,0	60,0	blau	7,0	0,9
3	4,7	21,0	„	4,0	1,1
4	18,0	spärlich	„	7,0	1,0
5	7,0	13,4	—	6,0	0,8
6	11,0	spärlich	blau	4,0	1,2
7	Zucker spärlich	„	„	5,5	0,6

In der Lösungskultur ist es kaum möglich die diastatische Kraft zu vergleichen, weil der Verbrauch des erhaltenen Zuckers groß ist und in solchem enzymatisch schwachen Zustande die Verzuckerung von verschiedenen Bedingungen beeinflußt wird.

III. Vergleichende Versuche mit A. ochraceus-ähnlichen Arten.

1. Reiskultur.

10 g Reis + 10 g Wasser, 4 Tage bei 27—28° C.

In allen folgenden Versuchen war das Wachstum des A. ochraceus (II) ein sehr träges.

	1. A. ochraceus (I)	2. A. ochraceus (II)	3. Onikipilz	4. A. melleus
Konidienträger	0,7—1,0 mm	0,7—1,0 mm	0,7—1,3 mm	0,7—1,0 mm
Stieldicke	7—12 μ	10—14 μ	—	— (sehr viel kolbenförmig)
Blase[2])	17—35 μ	30—45 μ	30—35 μ	15 μ
Sterigmen primär . . .	7 μ	8 μ	8 μ	s. v. nicht verzw.
Sterigmen sekundär . .	7 μ	7 μ	7 μ	10 μ

---

[1]) Aus Katsuobushi.

[2]) Kugelig, sonst nicht bemerkt.

1. Reiskultur (Fortsetzung).

10 g Reis + 10 g Wasser, 4 Tage bei 27—28° C.

	1. A. ochraceus (I)	2. A. ochraceus (II)	3. Onikipilz	4. A. melleus
Enzymfiltrat: 100 ccm Wasser zugesetzt und filtriert.				
Azidität: (Filtrat = 10 ccm)	0,6 N/10	0,7	0,6	0,6
Katalase	+	+	+	+
Peroxydase	—	—	—	—
Diastatische Kraft: 100 ccm 2-proz. Stärkelösung + 10 ccm Enzymfiltrat bei 55° C.				
Einwirkungsdauer: 20 Min. } Jodreaktion	blaupurpur	blaupurpur	blaupurpur	blaupurpur
1,5 Std. } Jodreaktion	„	„	„	purpur
5,0 „ } Jodreaktion	purpur	purpur	purpur	rotpurpur
5 Std. ccm Lösung für 10 ccm Fehlg. Lösung	21	22	41	17
Gelatineverflüssigungskraft.				
12.—15. Juli	3,0	3,0	2,5	3,5

2. Reiskultur.

10 g Reis + 10 ccm Wasser bei 27—28° C.

	1.	2.	3.	4.
Konidienträger	0,23—0,46 mm	0,23—0,70 mm	1,0—1,2 mm	0,23—0,46 mm
Stieldicke	10—14 μ	10—14 μ	10—14 μ	5—10 μ (meist kolbenförmig)
Blase	25—40 μ	25—35 μ	25—35 μ	11—14 μ
Sterigmen primär	11 μ	6 μ	9 μ	einfache 7—9 μ
Sterigmen sekundär	8—6 μ	7 μ	9 μ	verzw. prim. 7 μ sek. 5 μ

3. Kleienkultur.

10 g Kleie + 10 g Wasser, 7 Tage bei 27° C.

	1.	2.	3.	4.
Konidienträger	0,46-0,9 mm	0,23-0,46 mm	0,35-0,8 mm	0,30-0,46 mm
Stieldicke	11 μ	11 μ	11 μ	9 μ
Blase	—50	23—35 μ	35—50 μ	20—35 μ
Sterigmen primär	11 μ	4,6 μ	4,6 μ	5,0 μ
Sterigmen sekundär	7 μ	7,0 μ	9,0 μ	7,0 μ
Sklerotien	0,7 mm (reichlich gebildet)	—	—	—

Enzymfiltrat: 100 ccm Wasser zugesetzt und filtriert.

a) Bohnen lösende Kraft: 10 g entfettetes Sojabohnenmehl mit 100 g Wasser 3 Stunden lang unter 3 Atmosphären gedämpft und mit 25 ccm Filtrat 3 Tage bei 30° C (5 ccm Toluol) digestiert.

	Kontrolle	1.	2.	3.	4.
Gesamt-N im Rückstand .	0,3892	0,3024	0,2044	0,2786	0,2520
Gesamt-N in dem Filtrat	0,2212	0,2912	0,4032	0,3738	0,3934

b) Diastatische Kraft: 100 ccm 2-proz. Stärkelösung + 10 ccm Enzymfiltrat bei 50—52° C.

Einwirkungsdauer:		1.	2.	3.	4.
0,5 Std.	Jodreaktion	blau	blaupurpur	blau	blaupurpur
1,0 „		purpur	purpur	purpur	purpur
4,0 „		rotpurpur	rotpurpur	rotpurpur	rotpurpur
4,0 „ ccm für 10 ccm Fehlg. Lösung . . .		8,8	7,0	9,8	6,5

c) Gelatineverflüssigungskraft: 13 Tage in Mitte Juli.

	8,0	11,0	7,0	12,0

4. Bohnenmehlkultur.

10 g entfettetes Sojabohnenmehl + 10 g Wasser, 4 Tage bei 27—28° C.

		1.	2.	3.	4.
Konidienträger		0,7—1,2 mm	Konidienbildung sehr schlecht	0,45-0,70 mm	1,0—1,5 mm
Stieldicke		11 μ	—	10—12 μ	15—23 μ
Blase		35 μ	—	23—46 μ	30—46 μ
Sterigmen	primär . . .	7 μ	—	6 μ	einfache 10 μ
	sekundär . .	7 μ	—	7 μ	verzw. prim. 7 μ verzw. sek. 6 μ

Enzymfiltrat: 100 ccm Wasser zugesetzt und filtriert.

	1.	2.	3.	4.
Gesamt-N im Rückstand .	0,2128	0,1470	0,1750	0,1008
Filtrat:				
Azidität (Lg.= 10 ccm) .	0,8	5,5	3,7	4,7
Katalase	++	++	++	++
Peroxydase	—	—	—	—

Diastatische Kraft.

100 ccm 2-proz. Stärkelösung + 10 ccm Filtrat bei 50° C.

Einwirkungsdauer:		1.	2.	3.	4.
20 Min.	Jodreaktion	blaupurpur	blaupurpur	blaupurpur	blaupurpur
1,5 Std.		„	„	„	„
5,0 „		purpur	purpur	purpur	rotpurpur
10,0 „ ccm für 10 ccm Fehlg. Lösung . . .		14,2	11,0	28,5	8,0

5. Bohnenkultur.

5 g Bohnen + 10 g Wasser bei 27—28° C.

	1.	2.	3.	4.
Konidienträger . .	0,7—1,0 mm	Konidienbildung schlecht	0,7—1,0 mm	0,23—0,50 mm
Stieldicke	9—14 μ	—	10—17 μ	9—11 μ (viele kolbenförmig)
Blase	35—47 μ	—	23—35 μ	11—20 μ
Sterigmen primär	7 μ	—	7 μ	7 μ
Sterigmen sekundär	7 μ	—	7 μ	6 μ (einf. Sterigmen auch manchmal vorhanden)

Im Anfange des Wachstums unterscheiden sich die Farbnuancen der Rasen nicht voneinander, später tritt aber ein Unterschied auf.

	1.	2.	3.	4.
Nach einiger Zeit .	braungelb	weißlichgelb	braungelb, aber nicht so dunkel wie (1)	etwas hellgelb

6. Kojiagarkultur.

Kojidekokt 10° Ba mit 2 Proz. Agar-Agar und 2 Proz. Tannin, 4 Tage bei 25 bis 27° C.

	1.	2.	3.	4.
Konidienträger . .	0,6—1,2 mm	Konidienbildung schlecht	0,23—0,45 mm	0,46—0,8 mm
Stieldicke	11—13 μ	—	4,5—5 μ (kolbenförmig)	8,0 μ (kugelig, sowie kolbenförmig
Blase	—46 μ	—	20 μ	25—35 μ
Sterigmen primär	7 μ	—	allgemein	viele einfach
Sterigmen sekundär	11 μ	—	einfach 10 μ	11 μ

7. Temperaturoptimum für das Wachstum.

Nährboden: Kojiagargelatine.

Kulturdauer:	15°	23—25°	28—30°	37°
2 Tage	—	(1) (3) (4) etwas entwickelt	(1) (3) (4) gut entwickelt	(4) entwickelt
5 Tage	(1) (3) (4) etwas entwickelt	(1) (3) (4) Konidien reichlich gebildet (2) kaum entwickelt	(1) (3) (4) Konidien reichlich gebildet (2) kaum entwickelt	beinahe keine Entwicklung (4) ausgenommen

8. Kojigelatine- (10 Proz. Gelatine) Kultur.

	1.	2.	3.	4.
Verflüssigte Säule (16. Sept. bis 14. Okt.)	1,2	1,8	2,2	2,4 ccm

Zusammenfassung.

1. Nach meinen Untersuchungen ist A. glaucus der allergemeinste Pilz bei der Katsuobushibereitung, während A. melleus und A. gymnosardae nicht gefunden wurden.

2. A. Wentii wurde auch isoliert und seine Eigenschaften etwas näher untersucht. Aber er zeigte keine besondere stärkere enzymatische Kraft.

3. Ein neuer Aspergillus mit schwefelgelbem Rasen wurde isoliert und als Varietät des A. sulfureus betrachtet.

4. Unter vier A. ochraceusartigen Arten entwickelt sich der A. ochraceus (W) besonders langsam, mit schlechter Konidienbildung.

5. Die Sterigmen des A. melleus sind sehr oft einfach, besonders auf Reiskultur.

6. Unter den vier Arten hat A. melleus die stärkste diastatische und proteolytische Kraft.

7. Außerdem lassen sich bei den genannten vier Arten andere Merkmale, z. B. Rasenfarbe, Sklerotienbildungsfähigkeit usw. unterscheiden.

8. Aber ob diese Abweichungen hinreichen, um eine besondere Spezies aufzustellen, ist die Frage. Ich bin geneigt, sie alle unter A. ochraceus zusammenzufassen.

9. Eine und dieselbe Art variiert in verschiedener Weise, je nach den Kulturbedingungen; Sklerotien des A. melleus z. B. konnte ich niemals beobachten, obwohl sie nach Yukawa eine bemerkbare Eigentümlichkeit bilden. Einige solcher Veränderungen kommen wahrscheinlich nicht selten vor, wie aus den Versuchsresultaten ersichtlich ist. Deshalb ist es nicht zweckmäßig, durch leicht veränderliche Unterscheidungsmerkmale eine besondere Spezies zu bilden. Dies ist der Grund, warum ich unsere schwefelgelbe Aspergillusart als eine Varietät behandele. Jedenfalls bedarf der A. sulfureus weiterer Untersuchungen. Bei unserer Art habe ich schon beobachtet, daß sie sich durch etwa einjährige künstliche Kultur allmählich verändert.

Nachdruck verboten.

Über die Asporogenität der Sojahefen.

[Aus dem Techn. Institut d. Kaiserl. Universität zu Tokio, Japan.]

Von **G. Kita.**

Mit 1 Tafel.

Daß bei der Sojabereitung einige Hefen eine wichtige Rolle spielen, ist allgemein bekannt, und bis heute sind zahlreiche Untersuchungen über die Hefen der Sojamaische veröffentlicht worden, die aber in ihren Ergebnissen auseinander gehen. Dr. Saito, der zuerst in dieser Hinsicht ausführlich untersuchte, hat eine neue Spezies **Saccharomyces soja** gefunden, während Mitsuda, Nishimura und ich nicht sporenbildende Arten isolierten. Später wurden einige sporenbildende Hefen, die aber nicht zu Saccharomyces, sondern zu Zygosaccharomyces gehören, von Takahashi und Yukawa als wichtige Sojahefen genannt.

Allerdings finden wir darin eine nahe verwandte Art, die im Verhalten gegen Galaktose und ihre Sporenbildungsfähigkeit abweicht. während die 5 Arten Mitsudas durch ihr Verhalten gegen Sukrose gründlich verschieden sind. Die Vergärungskraft von Galaktose hat nur Saitos Art, während es Nishimuras, Takahashis und Yukawas und meiner Art an dieser Kraft fehlt, die wahrscheinlich eine ihre gemeinsame Eigenschaft sein wird.

In bezug auf Sporenbildung konnte Saito in üblicher Weise auf Gips diese Fähigkeit nicht konstatieren, sondern fand in Zellen des Heferinges in Kojidekoktkultur sporentragende Zellen, die nach seiner Abbildung wie Zygosaccharomyces aussehen. Ich und andere konnten jedoch diese Erscheinung kaum bemerken, obwohl Takahashi und Yukawa berichten, daß sie nach sehr langer Zeit einmal einige solcher Zellen haben beobachten können.

Takahashi und Yukawa berichten ferner, daß sie im Hefering bei der Kultur mit verdünnter Sojasauce diese Fähigkeit leicht wiederfinden konnten, indem sie die Hefen in dreimal verdünnter Sojasauce (4—5 % NaCl-haltiger) die ersten 3 Tage bei 27—28° C, dann bei etwa 20° C weiter züchteten und binnen 5—12 Tagen reichliche Sporenbildung in typischer Form von Zygosaccharomyces im Hefering fanden. Sie sagen deshalb, daß ihre spezielle Methode die einzig sichere sei, um die Sporenbildungsfähigkeit der Sojahefen zu bestimmen, weil sie alle bisher bekannten Verfahren für die Prüfung der Sporenbildung vergebens versuchten.

Um dies festzustellen, nahm ich die Frage wiederum auf und untersuchte genau nach den Angaben von Takahashi und Yukawa nicht nur bei meiner, sondern auch bei anderen isolierten Arten diese Fähigkeit, aber ohne Erfolg.

Die beiliegenden Abbildungen zeigen die Form der Zellen, deren Inhalt allgemein körnig ist und die manchmal eine große Vakuole enthalten.

Hier ist noch zu bemerken, daß das, was ich als Sojahefen bezeichne, nicht kahmbildende Arten sind, die gewöhnlich in der warmen Jahreszeit auf minderwertigen Sojasaucen vorkommen, sondern Arten, die in Sojamaische reichlich sich entwickeln.

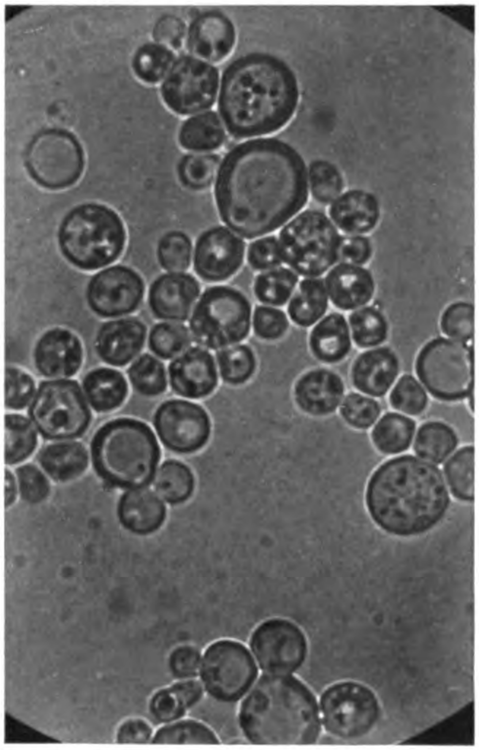


Fig. 1.

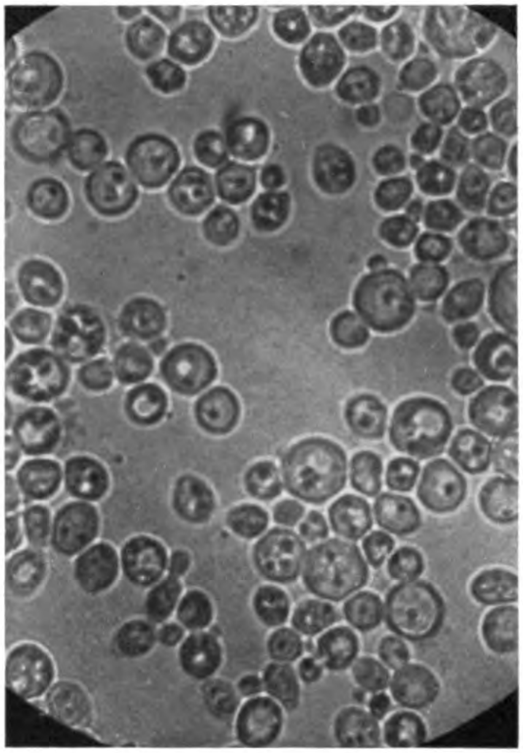


Fig. 2.

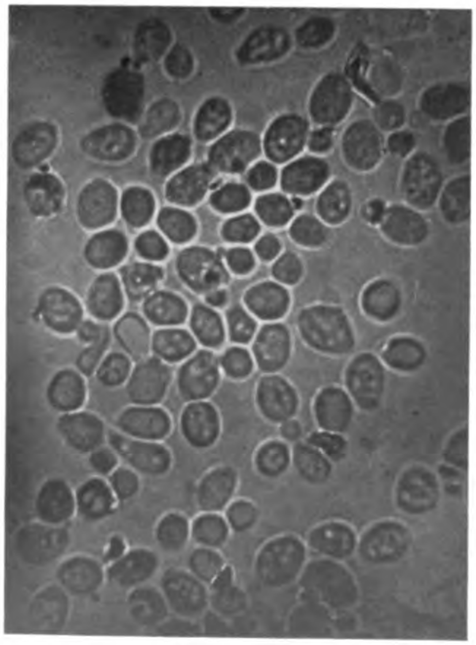


Fig. 3.

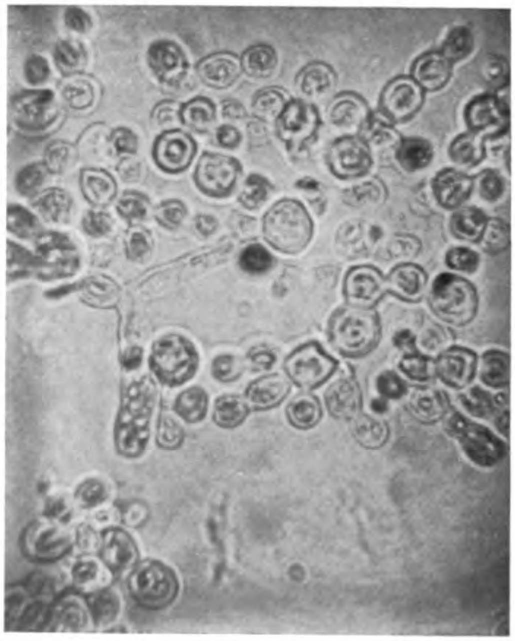


Fig. 4.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Tafelerklärung.

Fig. 1. S-Art. 2,5-monatige Kultur in verdünnter Sojasauce nach T. u. Y.s Angabe.

Fig. 2. K-Art. 2,5-monatige Kultur in verdünnter Sojasauce nach T. und Y.s Angabe.

Fig. 3. M-Art. 2,5-monatige Kultur in verdünnter Sojasauce nach T. und Y.s Angabe.

Fig. 4. F-Art. 1,5-jährige Kultur in Kojidekokt. Bei Zimmertemperatur.

Vergr. ca. 1100.

Literatur.

Saito, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 17. p. 104, 152.
Mitsuda, Journ. Coll. Agricult. Imp. Univ. Tokio. Vol. 1. p. 345.
Nishimura, Naikoku-Sei-Isan. [Japanisch].
Takahashi u. Yukawa, Eight internat. Congr. of App. Chem. Vol. 19. p. 158.
Kita, Ibid. p. 99.
—, Wochenschr. f. Brauerei. 1913. p. 561.

Nachdruck verboten.

Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten und Ammoniak durch Bakterien.

[Arbeit aus dem Botanischen Institute der Universität Marburg.]

Von **M. Klaeser.**

Mit 10 Textfiguren.

Inhaltsübersicht.

Seite
I. Teil. Methoden 366
1. Kapitel:
Methode für den Nachweis von Nitrat, Nitrit und Ammoniak nebeneinander 366
2. Kapitel:
Methode für die quantitative Bestimmung von Nitrat, Nitrit und Ammoniak 371
3. Kapitel:
Methode der Bakterienzählung 379
II. Teil. Untersuchungen über die Nitratreduktion 380
1. Kapitel:
Allgemeines über das Verhalten der Bakterien gegenüber Nitraten und Nitriten 380
a) Verhalten der Bakterien gegen Nitrate 380
b) Verhalten der Bakterien gegen Nitrite, mit Einschluß der hemmenden Wirkungen, die Nitrite auf das Wachstum der Bakterien ausüben . . 398
2. Kapitel:
Untersuchungen über den Einfluß, den verschiedene Faktoren auf die Reduktion von Nitraten und auf die Bildung von Nitrit und Ammoniak ausüben 406
a) Die Reaktion der Nährlösung 406
b) Die das Nitrat absättigende Base 411
3. Kapitel:
Quantitative Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Bakterienwachstum, Nitratreduktion, Nitrit- und Ammoniakbildung 413
4. Kapitel:
Die physiologische Bedeutung der Nitratreduktion für die Bakterienzelle und der Verlauf des Reduktionsprozesses 419
III. Teil. Anhang 422
1. Kapitel:
Die Gasbildung bei Bac. asterosporus 422
2. Kapitel:
Oxydieren die Bakterien Ammoniak zu Nitrit und Nitrat 425
3. Kapitel:
Bilden die Bakterien aus Pepton Ammoniak, Nitrit und Nitrat? 426

Der Vorgang der Bildung von Nitrit und Ammoniak aus Nitrat, die „Nitratreduktion“, durch Bakterien ist noch ungenügend geklärt, obgleich zahlreiche Untersuchungen darüber vorliegen.

Die bisher bekannten Tatsachen sind meist deshalb nicht als Grundlagen für weitere Forschungen verwendbar, weil sie an Bakterien vorgenommen wurden, welche nicht mit Sicherheit wieder zu erhalten sind, an undefinierten Spezies.

Herr Professor Arthur Meyer veranlaßte mich deshalb dazu, unter seiner Leitung mit den sogleich zu nennenden, von ihm und seinen Schülern genau beschriebenen, stets wieder aufzufindenden Spezies Untersuchungen über die Nitratreduktion vorzunehmen, um die in dem folgenden behandelten Fragen zu fördern.

Zu den Untersuchungen wurden folgende 28. aus der Sammlung des Instituts stammende Bakterienspezies benützt.

1. B. alvei Krompecher. 2. B. asterosporus (A. M.) Migula. 3. Bac. calidus A. M. et Blau. 4. B. carotarum Koch. 5. B. cohaerens A. M. et Gottheil. 6. B. cylindricus A. M. et Blau. 8. B. Ellenbachensis Stutzer. 8. B. fusiformis A. M. et Gottheil 9. B. graveolens A. M. et Gottheil. 10. B. lactis Flügge. 11. B. lacticola A. M. et Neide. 12. B. luteus Smith et Backer. 13. B. megatherium Heinze. 14. B. mycoides Flügge. 15. B. oxalaticus Kuntze. 16. B. parvus A. M. et Neide. 17. B. Petasites A. M. et Gottheil. 18. B. pumilus A. M. et Gottheil. 19. B. robur A. M. et Neide. 20. B. robustus A. M. et Blau. 21. B. ruminatus A. M. et Gottheil. 22. B. simplex A. M. et Gottheil. 23. B. silvaticus A. M. et Neide. 24. B. sphaericus A. M. et Neide. 25. B. subtilis Cohn. 26. B. teres A. M. et Neide. 27. B. tostus A. M. et Blau. 28. B. tumescens Zopf.

I. Teil.

Methoden.

1. Kapitel.

Methode für den Nachweis von Nitrat, Nitrit und Ammoniak nebeneinander.

Qualitativer Nachweis der Salpetersäure.

Für den qualitativen Nachweis der Salpetersäure gibt es eine ganze Anzahl von Methoden, die wegen der Leichtlöslichkeit der Nitrate meist auf Farbreaktionen beruhen. Ich nenne hier nur die Reaktion mit Brucin, die in einer roten, die Reaktion mit Diphenylamin, die in einer blauen, und die mit Ferrosalzen, die in einer braunen Färbung besteht.

Bei Arbeiten über Nitratreduktion durch Bakterien hat bis jetzt nur die vorletzt genannte Reaktion zum Nachweis der Salpetersäure Verwendung gefunden. Sie wird beispielsweise von Frankland (1888. p. 375), Maassen (1902. p. 32) und von Gredig (1906) benutzt. Wegen der intensiv blauen Färbung, die Diphenylamin mit Nitraten gibt, sowie wegen der Empfindlichkeit der Reaktion, eignet sich diese Methode auch sehr zum Nitratnachweis in Bakterienkulturen. Sie hat aber, wie alle auf Oxydation beruhenden Reaktionen, den Nachteil, daß sie auch von anderen Stoffen, wie Kaliumpermanganat, Bromwasser und Wasserstoffsuperoxyd hervorgerufen wird, also unter Umständen gar keine Salpetersäure anzuzeigen braucht.

Da derartige Stoffe in der Regel in Bakterienkulturen nicht vorkommen, so ist trotzdem Diphenylamin hier ein im allgemeinen einwandfreies Reagens auf Salpetersäure. Eine sehr empfindliche Reaktion auf Nitrate ist auch die Brucinprobe. Sie hat vor der Diphenylaminreaktion den Vorteil, daß sie nur von Salpetersäure hervorgerufen wird, nicht aber von salpetriger Säure. Die Zerstörung der Nitrite, welche bei Anwendung von Diphenylamin notwendig ist, wäre also hier überflüssig und damit das Arbeiten bedeutend vereinfacht. Bei Versuchen, die mit mehreren Bakterienspezies angestellt wurden, stellte sich aber heraus, daß beim Versetzen der Kulturen mit der konz. Schwefelsäure, die bei der Brucinprobe notwendig ist, fast immer rote Färbungen auftreten, die einen nachfolgenden einwandfreien Nitratnachweis unmöglich machten[1]). Die sehr charakteristische Reaktion der Nitrate mit Ferrosalzen ist in Bakterienkulturen kaum zu verwenden, da die braune Färbung in gefärbten Kulturen sich nicht gut erkennen läßt. Es wurde darum in allen Fällen beim Nachweis der Salpetersäure vom Diphenylamin Gebrauch gemacht. Zum Zerstören der salpetrigen Säure wurde Chlorammonium benutzt, womit sich das Nitrit sicher und bequem entfernen läßt. Ich konnte dabei nicht feststellen, daß sich Salpetersäure aus der salpetrigen Säure bildete, wie es bei dieser Art des Zerstörens immer der Fall sein soll. Es liegt dies wohl daran, daß es sich immer nur um sehr geringe Nitritmengen handelte.

Der Nitritnachweis gestaltete sich im einzelnen Falle in folgender Weise: Etwa 1 ccm der unverdünnten Bakterienkultur wurde in ein Reagensglas gebracht, mit etwa der gleichen Menge des Diphenylamin-Reagenses unterschichtet und aus der entstehenden Blaufärbung auf die ungefähre Menge der vorhandenen Salpetersäure geschlossen. Das erforderliche Reagens wurde in folgender Weise dargestellt (vergl. Treadwell p. 348): 0,5 g Diphenylamin wurden in 100 ccm konz. reiner Schwefelsäure gelöst, wobei noch 20 ccm Wasser zugefügt wurden.

War Nitrit in den Kulturen vorhanden, so wurde ein Teil der Kultur zunächst mit 5—10 ccm einer 10-proz. Chlorammoniumlösung versetzt, 1½ Stunde unter Rückflußkühlung zum Sieden erhitzt, auf ihr voriges Volumen gebracht und dann in der vorbeschriebenen Weise auf Salpetersäure geprüft.

Qualitativer Nachweis der salpetrigen Säure.

Der qualitative Nachweis der salpetrigen Säure ist sehr leicht zu erbringen, auch in Bakterienkulturen, da es eine Reihe von guten Nitritreaktionen gibt. Ich nenne hier vor allem die Reaktion mit Sulfanilsäure und α-Naphthylamin, die von Riegler angegebene Reaktion mit naphthylaminsaurem Natrium und β-Naphtol und die von Erdmann empfohlene Reaktion mit Amidonaphtol-K-Säure. Alle beruhen auf der Bildung von intensiv gefärbten Azofarbstoffen, werden also nur von salpetriger Säure hervorgerufen. Daneben gibt es noch einige viel verwandte Nachweismethoden von Nitrit, die aber für Bakterienkulturen weniger zu empfehlen sind. Hierher gehören die Reaktion mit Phenylendiamin und die mit Zinkjodidstärkekleister. Auch mit Diphenylamin kann man Nitrite nachweisen, in eindeutiger Weise natürlich nur dann, wenn Salpetersäure nicht zugegen ist.

---

[1]) Auch die mit Iridiumoxyd in konz. Schwefelsäure auszuführende Reaktion von Iwanow (Chem. Ztg. 1912. p. 157) wird für die Untersuchung von Bakterienkulturen unbrauchbar sein.

Soweit aus der Literatur zu ersehen ist — es fehlen manchmal Angaben über die Art, wie das Nitrit nachgewiesen wurde —, ist Metaphenylendiamin nur in wenigen Fällen bei Arbeiten über Nitratreduktion durch Bakterien zum Nitritnachweis benutzt worden. Warington (1888. p. 747), Stutzer (1898) und auch Maassen (1902. p. 32) wenden es an; die beiden letzgenannten gebrauchen aber daneben auch noch Sulfanilsäure und α-Naphtylamin; Phenylendiamin ist von den genannten Nitritreaktionen zum Nachweis der salpetrigen Säure in Bakterienkulturen wenig geeignet, da die gelb bis gelbbraune Färbung, die es mit Nitriten gibt, in dunkel gefärbten Kulturen nur schwer wahrzunehmen ist. Häufiger als Methaphenylendiamin hat Jodzinkstärkekleister Verwendung gefunden, beispielsweise machen Vahle (1909. p. 48), Warington (1888. p. 747) und Gredig (1906) davon Gebrauch. Wegen der schönen blauen Farbe, die Jod und Stärke mit Nitrit geben, läßt diese Nachweismethode sich sehr gut in Bakterienkulturen verwenden. Auch die Tatsache, daß die Reaktion sehr empfindlich ist, — es läßt sich mit Jodzinkstärkekleister noch ein Teil Nitrit in 50 Millionen Teilen Wasser nachweisen —, macht sie empfehlenswert. Sie hat aber den Nachteil, daß sie auf einer Oxydation beruht, also auch von anderen Substanzen hervorgerufen wird. Wenn diese auch, ähnlich wie bei Diphenylamin, in der Regel in Bakterienkulturen nicht vorkommen, so ist doch diese Reaktion zu entbehren, weil wir andere ganz spezifische Nitritreaktionen haben. Von diesen auf der Bildung von Azofarbstoffen beruhenden Methoden hat bis jetzt nur die von Grieß (1879. p. 427) angegebene Reaktion mit Sulfanilsäure und α-Naphtylamin zum Nitritnachweis in Bakterienkulturen Verwendung gefunden. So wird sie von Maassen (1902. p. 32), Dieudonné (1895. p. 508), Marchal (1893. p. 768), Frankland (1888. p. 376) benutzt, und zwar meist in der Modifikation von Ilosva, also in essigsaurer Lösung. Luncewicz (1895. p. 945) und Pelz (1911) empfehlen sie ebenfalls, und sie eignet sich in der Tat sehr zum Nachweis der salpetrigen Säure. Ein Intensitätsunterschied in der roten Farbe ist auch in stark gefärbten Kulturen sehr gut zu erkennen, die Reaktion ist sehr empfindlich — ein Teil Nitrit läßt sich noch in 100 Millionen Teilen Flüssigkeit nachweisen — und sie wird von keinem anderen Stoff als salpetriger Säure hervorgerufen. Ich habe deshalb diese Methode ebenfalls in allen Fällen, wo ich Nitrit in den Kulturen nachzuweisen hatte, benutzt. Naturgemäß ist die Empfindlichkeit in stark gefärbten Kulturen oder in solchen, die Pepton enthalten, nicht so groß wie in reinem Wasser. Qualitativ fällt dies aber nicht ins Gewicht, auch hatte ich nur in wenigen Fällen mit solchen gefärbten Kulturen zu tun.

Ebensogut wie Sulfanilsäure und α-Naphthylamin hätten sich auch das Erdmannsche sowie das Rieglersche Reagens zum Nitritnachweis in den Kulturen benutzen lassen.

Der qualitative Nachweis des Nitrits geschah in unserem Falle in folgender Weise:

Lösung I: α-Naphthylamin 0,1, Ag. dest. 20, Acid. acet. dil. 150.

Lösung II: Acid. sulfanilic. 0,5, Acid acet. dil. 150.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Etwa 1 ccm des aus Lösung I und II gemischten Reagenses wurden in ein Glas gebracht und zum Sieden erhitzt. Sodann wurde die gleiche Menge der Bakterienkultur hinzugefügt und wieder erhitzt. Aus der Intensität der entstehenden Rotfärbung, die auf diese Weise schon innerhalb weniger Sekunden ihren Höhepunkt erreicht, kann bis zu einem gewissen Grade mit auf die Menge des vorhandenen Nitrits geschlossen werden.

Ich bemerke hier, daß man beim Anstellen der Reaktion vorsichtig sein muß. In Reagensgläsern, die längere Zeit nach dem Reinigen an der Luft gestanden haben, setzt sich leicht Nitrit ab; ebenso bleiben in öfters zum Nitritnachweis benutzten Gläsern trotz sorgfältigen Reinigens leicht Spuren von Nitrit zurück, die zu Irrtümern führen können. Es ist deshalb zweckmäßig, vor dem Anstellen der Reaktion das Reagens zu erhitzen, und erst, wenn keine Färbung eintritt, die zu prüfende Flüssigkeit zuzusetzen.

Qualitativer Nachweis von Ammoniak.

Zum Nachweis von Ammoniak in Bakterienkulturen kommt nur die Reaktion mit Neßlers Reagens in Betracht, da alle anderen Methoden für die hier meist vorliegende kleine Menge zu unempfindlich sind. In reinwäßrigen Lösungen kann man das Reagens direkt zu der zu untersuchenden Flüssigkeit hinzufügen und so das Ammoniak einwandsfrei nachweisen. In Bakterienkulturen ist dies Verfahren nicht brauchbar, da die in ihnen vorhandenen organischen Substanzen, beispielsweise Kohlehydrate, Aldehyde, Amine, ähnliche Niederschläge mit dem Reagens geben, wie Ammoniak. Um das Ammoniak hier einwandsfrei nachweisen zu können, muß man es zunächst mittels irgendeiner Base in eine Vorlage überdestillieren; hierin liegt die Hauptschwierigkeit beim Ammoniaknachweis. Unter der Einwirkung der Base können nämlich stickstoffhaltige organische Substanzen, die in den Kulturen sich befinden, ebenfalls Ammoniak abspalten und so falsche Resultate veranlaßt werden. Zum Austreiben ist deshalb nur eine solche Base brauchbar, welche auf solche labile Körper nicht oder doch nicht in praktisch merkbarer Weise einwirkt. Von den vielen vorgeschlagenen Austreibemitteln scheint am besten das von Folin zuerst empfohlene Natriumkarbonat in Verbindung mit Natriumchlorid (auf 2 g Na_2CO_3 10 g $NaCl$, um die Dissoziation der Soda herabzusetzen), diesen Zweck zu erfüllen. Außer der Base ist auch die Temperatur, bei der die Destillation vorgenommen wird, von Einfluß. Schon Boussingault (1850. p. 281) hatte beobachtet, daß eine Abspaltung nicht präformierten Ammoniaks vermieden wird, wenn man statt bei 100° im Vakuum bei etwa 40° destilliert. Die Angabe ist später von anderen Forschern bestätigt worden. So geben Schittenhelm (1903. p. 75) und auch Grafe (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. p. 300) an, daß sie bei Vakuumdestillation und Na_2CO_3 mit $NaCl$ als Austreibemittel bei Urin, Faeces, Hundeblut resp. tierischen Geweben richtige Ammoniakwerte erhalten haben. Vielleicht noch sicherer als die Vakuumdestillation ist das zuerst von Folin (1902/1903. p. 164) vorgeschlagene Ausblaseverfahren, da man hier bei Zimmertemperatur arbeiten kann. Ich verweise hierfür auf den quantitativen Teil. Für qualitative Versuche sind beide Verfahren,

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

besonders das erste, etwas umständlich und zeitraubend. Man wird hier im allgemeinen einfacher verfahren können. Statt bei 40° kann man hier bei 100° destillieren; treibt man nur wenige Zentimeter über, so beschränkt sich die Einwirkungszeit der Base auf wenige Minuten; eine Abspaltung nicht präformierten Ammoniaks ist also kaum zu befürchten. Besonders in unserem Falle war die Anwesenheit solcher labiler Ammoniak abgebender Körper nicht wahrscheinlich, da, mit Ausnahme der Versuche über Peptonabbau, Ammoniak nur in solchen Kulturen bestimmt wurde, die als Nährquelle neben mineralischen Salzen ein Nitrat und eine Kohlenstoffverbindung enthielten. Als Base zum Austreiben wurde auch nicht Natriumkarbonat und Kochsalz benutzt, sondern Magnesiumoxyd, bei dem ein viel gleichmäßigeres Sieden stattfindet. Auch werden die Kulturen bei dessen Einwirkung nicht dunkelbraun gefärbt, wie ich es bei einigen Versuchen mit Soda und Kochsalz beobachten konnte.

Bei dem gewählten Arbeitsverfahren kann man nicht sagen, daß die Angaben über das Vorhandensein von Ammoniak in den Kulturen absolut sicher sind. Es spricht aber sehr für die Richtigkeit meiner Resultate die Tatsache, daß bei quantitativen Versuchen mittels des Folinschen Verfahrens und Na_2CO_3 mit NaCl als Base — also dem sichersten Verfahren, welches wir bis jetzt kennen —, bei mit beiden Methoden geprüften Bakterien genau dieselben Resultate erzielt wurden.

Die Ausführung des Ammoniaknachweises gestaltete sich also in folgender Weise:

Etwa $^4/_5$ der angesetzten Kultur — etwa 40 ccm — wurden in einen Destillationskolben gebracht, ein kleiner Löffel voll Magnesia hinzugefügt und der Kolben sofort mittels eines Sicherheitsrohres, das den Zweck hatte, ein Überspritzen des Kolbeninhaltes in die Vorlage zu verhindern, an einen Kühler mit Vorlage angeschlossen. Es wurde sodann zum Sieden erhitzt, etwa 2—3 ccm Flüssigkeit übergetrieben, diese mit 5—10 Tropfen von Neßlers Reagens versetzt und aus der entstehenden Fällung auf die relative Menge des in der Kultur vorhandenen Ammoniaks geschlossen. Spuren von Ammoniak, wie sie sich z. B. im Wasser durch Gelbfärbung erkennen lassen, konnten in den Kulturen nicht nachgewiesen werden, da die Nährlösung allein bei der vorbeschriebenen Behandlung mit dem Reagens einen gelben Niederschlag gab. Das erforderliche Neßlersche Reagens kann man in folgender Weise bereiten (vergl. König, Bd. 3. p. 260).

50 g Kaliumjodid werden in 50 ccm heißem Wasser gelöst und mit einer konzentrierten Quecksilberchloridlösung versetzt, bis der dadurch gebildete rote Niederschlag sich nicht mehr löst; hierzu sind 20—25 g Quecksilberchlorid erforderlich. Man filtriert, vermischt mit einer Lösung von 150 g Kaliumhydroyd in 300 ccm Wasser, verdünnt auf 1 l, fügt noch etwa 5 ccm Quecksilberchloridlösung hinzu, läßt den dabei entstehenden Niederschlag absetzen und dekantiert. Die Lösung muß in gut verschlossener Flasche aufbewahrt werden.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

2. Kapitel.

Methode für die quantitative Bestimmung von Nitrat, Nitrit und Ammoniak.

Quantitative Bestimmung der Salpetersäure.

Die gebräuchlichsten Methoden zur quantitativen Bestimmung von Salpetersäure sind: die Reduktion der Nitrate in saurer Lösung zu Stickoxyd, die Reduktion in saurer oder alkalischer Lösung zu Ammoniak, sowie die Behandlung im Lungeschen Nitrometer, wobei ebenfalls das entstehende Stickoxyd ein Maß für die Menge der vorhandenen Salpetersäure ist. Für die Nitratbestimmung in Bakterienkulturen sind aber die genannten Methoden wenig geeignet, da die hier vorhandenen verschiedenartigen Substanzen leicht Anlaß zu Nebenreaktionen geben, wodurch eine genaue Bestimmung fraglich wird. Eingehendere Angaben darüber, welche Schwierigkeiten der Anwendung der einzelnen Methoden in Bakterienkulturen entgegenstehen, finden sich bei Franzen und Löhmann (1909. p. 53). Am ehesten geeignet ist noch die Reduktion des Nitrates in saurer Lösung mit Schwefelsäure und Eisen zu Ammoniak, wie sie von Stoklasa und Vítek (1905. p. 183) zu ihren Bestimmungen bei einer großen Anzahl von Bakterien verwendet wurde. Es ist aber auch hier nicht außer acht zu lassen, daß unter diesen Umständen auch organische Substanzen, die in den Kulturen vorhanden sein können, Ammoniak liefern. Von anderen Nitratbestimmungsmethoden kommen noch in Betracht die Fällung der Salpetersäure mit Nitron nach Busch (1905. p. 861) und die kolorimetrische Bestimmung mittels einer der im qualitativen Teil genannten Farbreaktionen. Eine Titration des Nitrates mit Indigo, wie sie von Heraeus (1886. p. 193) benutzt wurde, war ausgeschlossen, da die hier benutzte Entfärbung des Indigo durch Nitrate auf einer Oxydation beruht, also auch von jedem anderen in den Kulturen vorhandenen Oxydationsmittel hervorgerufen worden wäre. Franzen und Löhmann (1909. p. 52) haben bei ihren Nitrat und -Nitritbestimmungen in Kulturen von B. Kiliense, B. pyocyaneus, B. prodigiosus und anderen mit gutem Erfolg sich der Nitronmethode bedient. Ich beabsichtigte deshalb, ebenfalls diese Methode in Anwendung zu bringen. Probebestimmungen, die mit Nährlösungen angestellt wurden, — es kamen sowohl peptonhaltige, wie peptonfreie, denen eine bestimmte Menge Nitrat zugesetzt war, in Anwendung — lieferten auch sehr gute Resultate. Als ich aber in Bakterienkulturen, es waren solche von B. tumescens, das Nitrat auf diese Weise bestimmen wollte, stieß ich unerwartet auf Schwierigkeiten. Es fiel ständig mit dem durch das Nitrat verursachten Niederschlage ein grauschwarzer Niederschlag aus, der sich durch Auswaschen nicht entfernen ließ, und eine Bestimmung des Nitrates vollkommen unmöglich machte, da die gefundenen Werte immer viel zu hoch ausfielen. Worauf diese Erscheinung beruht, kann ich nicht sagen; Fällungen, die in reinen Nitratlösungen mit derselben Auflösung von Nitron und unter denselben Bedingungen gemacht wurden, lieferten exakte Resultate. Da ich nun B. tumescens unter allen Umständen zu den quantitativen Untersuchungen benutzen wollte, war ich gezwungen, eine andere Bestimmungsart zu wählen. Es kam nur noch eine kolorimetrische Methode in Frage. Diese Methoden werden vorzugsweise dann benutzt, wenn es sich um die Ermittlung sehr geringer Mengen handelt. Sie lassen sich aber auch sehr gut für die Bestimmung größerer Mengen anwenden, nur muß man bei den hier notwendigen Verdünnungen sehr exakt arbeiten, um die Versuchsfehler nicht zu stark anwachsen zu lassen. Denn da zur Ermittlung der Gesamtsumme, die einzelnen Resultate mit einem Faktor multipliziert werden müssen, der von dem Grade der Verdünnung abhängt, und hierbei die unvermeidlichen Fehler mit vervielfacht werden, so können diese unter Umständen sehr ins Gewicht fallen. Es ist dies ein Nachteil, den alle kolorimetrischen Methoden an sich haben, der sich allerdings, wie gesagt, durch exaktes Arbeiten fast ganz aufheben läßt. In Bakterienkulturen steht der Anwendung einer kolorimetrischen Bestimmungsart noch die besondere Schwierigkeit entgegen, daß die manchmal stark getrübten und gefärbten Flüssigkeiten die Farbe nicht voll zur Geltung kommen lassen. In unserem Falle kam dieser Umstand nicht in Betracht, da die untersuchten Kulturen nicht gefärbt waren und außerdem so stark verdünnt werden mußten, daß sie vollkommen wasserhell aussahen, auch wenn sie ursprünglich ganz trüb und undurchsichtig waren. Als Farbreaktion zum kolorimetrischen Vergleich wurde die mit Diphenylamin gewählt. In der gewöhnlichen Ausführung, wie sie im qualitativen Teil beschrieben ist, ist sie allerdings nicht zu kolorimetrischer Bestimmung der Nitrate zu gebrauchen, da die hier entstehende Färbung nicht beständig ist und außerdem die Reaktion nach Tillmann und Süthoff (1911. p. 8), je nach der Art der Ausführung, große Verschiedenheit in ihrer Schärfe zeigt. Es wurde deshalb eine etwas modifizierte Art, wie sie von den beiden genannten Forschern zur Bestimmung der Salpetersäure in Wasser ausgearbeitet wurde, benutzt. Der Unterschied von der gewöhnlichen Diphenylaminreaktion besteht in dem Zusatz von Chlor in Form von Natriumchlorid, wodurch einmal die genannten Nachteile wegfallen und die Reaktion gleichzeitig auch viel schärfer wird. Das erforderliche Reagens stellt man sich in folgender Weise her: 85 mg Diphenylamin werden in einen 500 ccm fassenden Meßkolben gebracht und 190 ccm verdünnte Schwefelsäure (1 + 3) aufgegossen. Darauf wird konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und umgeschüttelt. Nach dem Lösen des Diphenylamins füllt man mit konzentrierter Schwefelsäure fast bis zur Marke auf; dann wird abgekühlt, nach dem Abkühlen mit konzentrierter Schwefelsäure aufgefüllt und gemischt. Die Ausführung der Bestimmung geschieht in der Weise, daß man zu 100 ccm der nitrathaltigen Flüssigkeit 2 ccm kalt gesättigte Kochsalzlösung gibt, sodann 1 ccm der Lösung in ein Reagenzglas abmißt mit 4 ccm Reagens versetzt und sofort abkühlt. Nach etwa einer Stunde ist die stärkste Färbung erreicht, so daß die kolorimetrische Bestimmung stattfinden kann. Die Konzentration des Nitrates ist so zu wählen, daß sie etwa 0,05—0,25 mg pro 100 ccm Flüssigkeit beträgt. Unter einem Nitratgehalt von 0,05 mg tritt keine Färbung mehr ein, über 0,25 mg ist sie so stark, daß Intensitätsunterschiede sich nur schwer erkennen lassen. Eventuell vorhandenes Nitrit ist natürlich vor der Bestimmung zu zerstören, da es dieselbe Reaktion mit Diphenylamin gibt. Für die Zerstörung vergleiche qualitativen Teil p. 366. Zum kolorimetrischen Vergleich wurde das von Autenrieth und Königsberger (1910. H. 19) angegebene Kolorimeter benutzt, mit einer kleinen Umänderung nach Angaben von Herrn Prof. A. Meyer. Der Keil wurde oben durchbohrt, zwecks leichterer Füllung und mit einem eingeschliffenen Glasstöpsel die Öffnung geschlossen.

Die Normallösung zum Füllen des Keils wurde in folgender Weise hergestellt: 0,3744 mg reinstes Kaliumnitrat wurden in einen 100 ccm Meßkolben gebracht, 2 ccm gesättigte Kochsalzlösung sowie 10 ccm Eisessig

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

hinzugefügt und zur Marke aufgefüllt. (Der Zusatz des Eisessigs ist von Tillmann und Suthoff angegeben und verhindert Pilz- und Bakterienwachstum, so daß die Lösungen unbegrenzt lange haltbar sind.) Von diesen 100 ccm wurden 3 ccm in ein Glas gebracht, mit 12 ccm Reagens versetzt, abgekühlt, eine Stunde stehen gelassen und dann in den Keil hineingebracht, der damit gerade angefüllt war. Mittels dieser Keilfüllung konnten dann die zu untersuchenden Lösungen bestimmt werden, wenn bekannt war, wieviel Kaliumnitrat jeder Punkt der Skala entsprach. Dieses Aichen des Keils geschah in folgender Weise (vergl. Autenrieth-Königsberger 1910. p. 998): „In die Cuvette wurden Nitratlösungen von bekanntem Gehalt gebracht, der Keil bis zur Farbengleichheit mit diesen Lösungen verschoben und dann der Teilstrich der Skala auf dem am Keil befindlichen Zeigerstand abgelesen. Bei vier verschiedenen Konzentrationen ergaben sich folgende Werte:

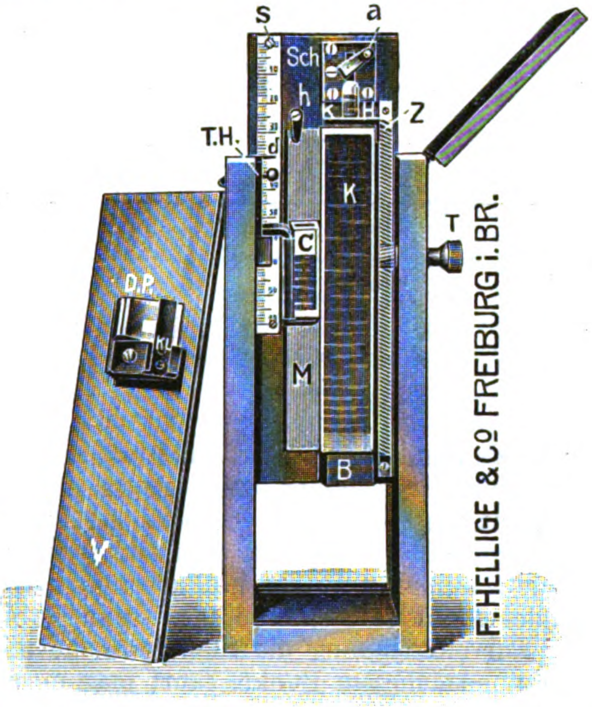


Fig. 1. Kolorimeter nach Prof. Dr. W. Autenrieth und Prof. Dr. J. Königsberger.

V = Vorderwand mit Doppelplatte (D. P.), KL = Klemmen, welche die Doppelplatte festhalten, Sch = hinterer Schieber mit Skala (S), Milchglasscheibe (M), Keilhalter (KH) und Zahnstange (Z), T.H. = Troghalter mit dem Trog (Cuvette) (C), an der linken Seitenwand befestigt.

a = Stellschraube des Troghalters, h = Häkchen zum Festhalten der Milchglasscheibe, d = Zeiger, K = auswechselbarer Keil, T = Trieb.

			Teilstriche
0,1498 mg KNO_3 in 100 ccm	=	70
0,1872 „ „ „ 100 „	=	59
0,2246 „ „ „ 100 „	=	45
0,2621 „ „ „ 100 „	=	33

Alle angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus mindestens fünf verschiedenen Bestimmungen.

Wurden die Nitratmengen, bezogen auf 100 ccm Lösung, auf die horizontale Abzissenachse, die abgelesenen Skalenteile auf die vertikale Ordinatenachse eines Koordinatensystems eingetragen, so bildete die Verbindungslinie der Schnittpunkte nahezu eine Gerade, wie das aus folgender Kurve zu ersehen ist:

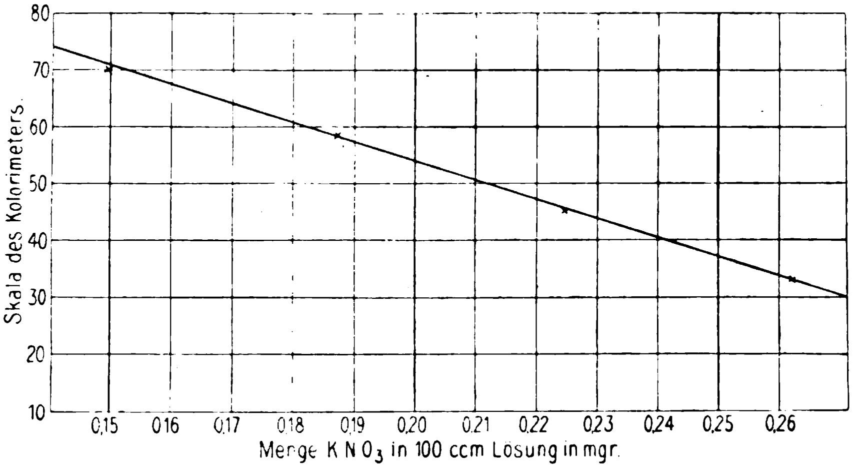


Fig. 2.

Um mit dieser Keilfüllung in einer Flüssigkeit von unbekanntem Nitratgehalt die Salpetersäure zu bestimmen, wird sie in der vorgeschriebenen Weise mit dem Reagens versetzt, in die Cuvette gefüllt und eine Anzahl Ablesungen (um einen guten Mittelwert zu erhalten) gemacht. Die Berechnung ist sehr einfach. Hat man z. B. gleiche Farbenintensitäten von Kultur und Cuvette bei Skalenteil 51 gefunden, so sucht man im Abstand 51 vom unteren Rande der Kurvenzeichnung die Stelle, wo die schwarz gezogene Nitratkurve durchgeht. An diesem Punkte fährt man genau abwärts, und findet ohne weiteres den Nitratgehalt, in diesem Falle 2,059 mg in 100 ccm. Der Keil mußte für jede Bestimmung neu gefüllt werden, da schon nach $1\frac{1}{2}$ Stunden die blaue Farbe sich zu zersetzen beginnt und schließlich schmutziggrün wird. Trotzdem dies ziemlich umständlich ist, wurde doch im Interesse der Genauigkeit davon abgesehen, die Lösung eines haltbaren blauen Farbstoffes, beispielsweise Methylenblau zum Füllen des Keils zu benutzen, da dieser Farbton doch niemals vollkommen mit dem der Diphenylaminreaktion übereingestimmt hätte.

Das Verfahren der Nitratbestimmung in den Kulturen gestaltete sich also folgendermaßen:

Von der auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Kultur wurde eine genau abgemessene Menge entnommen und soweit verdünnt, daß in 100 ccm etwa 10—25 mg Kaliumnitrat enthalten war, was durch eine Probebestimmung annähernd ermittelt wurde. Von dieser Verdünnung wurden dann 10 ccm in einen 100 ccm fassenden Meßkolben gebracht, mit 2 ccm Kochsalzlösung, etwa 10 ccm Eisessig versetzt und mit destilliertem, nitratfreiem Wasser zur Marke aufgefüllt. Hiervon wurde 1 ccm in ein Glas gebracht mit 4 ccm Diphenylaminreagens versetzt, abgekühlt und eine Stunde stehen gelassen, wobei die einzelnen Gläschen mehrmals umgeschüttelt wurden. Gleichzeitig wurde eine Normallösung zur Keilfüllung von dem vorher angegebenen Gehalt hergestellt. Nach Ablauf einer Stunde erfolgte jedesmal die

Bestimmung. Als Beleuchtungsquelle wurde meist die von A. Meyer konstruierte Mikroskopierlampe mit Auerbrenner benutzt (Beschr. 1903. p. 63), bei deren Licht sich die blauen Farben sehr gut miteinander vergleichen lassen.

War neben dem Nitrat noch Nitrit vorhanden, so wurden 20 ccm der Kultur in einen Destillationskolben gebracht mit etwa 5 ccm 10-proz. Chlorammoniumlösung versetzt, 1½ Stunde unter Rückflußkühlung erhitzt und die Lösung, wie vorher beschrieben, weiter behandelt.

Quantitative Bestimmung der salpetrigen Säure.

Für die quantitative Bestimmung der salpetrigen Säure neben Salpetersäure gibt es mehrere gute Methoden. Von diesen ist die Titration mit Kaliumpermanganat in Bakterienkulturen wegen der vielen hier vorhandenen organischen Substanzen nicht verwendbar, auch die Lungesche nitrometrische Methode eignet sich hier wenig. (Vergl. auch Kapitel über Salpetersäure.) Eine Bestimmung des Nitrits nach der Nitronmethode, wie sie von Franzen und Löhmann bei ihren Untersuchungen benutzt wurde, empfiehlt sich nur dann, wenn auch die Salpetersäure auf dieselbe Weise bestimmt wird, da die Ausführung sonst viel zu umständlich ist. Die von Stoklasa und Vítek (1905) in Anwendung gebrachte modifizierte Methode von Pellet kenne ich nicht näher. Die beste Art der Bestimmung ist die kolorimetrische mittels einer der schon im qualitativen Teil genannten Farbreaktionen, da diese Methode gerade für die sehr geringen Nitritmengen, wie sie in Bakterienkulturen meist vorkommen, geeignet ist. Schwierigkeiten können allerdings entstehen, wenn die Kulturen gefärbt oder stark getrübt sind. So hat Pelz (1910. p. 2) festgestellt, daß in Peptonlösungen die Empfindlichkeit gegenüber reinem Wasser von 0,00017 auf 0,00143 mg herabgesetzt ist. In unserem Falle war es günstig, daß die zur Nitritbestimmung benutzten Kulturen nicht gefärbt waren und die vorhandene Trübung bei der notwendig starken Verdünnung vollkommen außer Betracht kam. Als Farbreaktionen zum kolorimetrischen Vergleich kommen nur die im qualitativen Teil genannten, auf der Bildung von Azofarbstoffen beruhenden, in Betracht. Benutzt wurde das auch beim qualitativen Nachweis in Anwendung gebrachte Reagens von Gries, das sich bei Vorversuchen als praktisch herausstellte. Mennike (1900. p. 7—11), der mehrere Nitritreagentien auf ihre Brauchbarkeit zur quantitativen Bestimmung untersucht hat, gibt dem von Erdmann (1900. p. 33) angegebenen den Vorzug, und zwar besonders deshalb, weil dieses Reagens sich beim Aufbewahren nicht färbt und ein Ausfallen des Farbstoffes hier nicht möglich ist. Die schwache Rötung, die das von Gries empfohlene Reagens bei längerem Aufbewahren erleidet, fällt aber praktisch nicht ins Gewicht. Sie ist bei sachgemäßem Aufbewahren kaum sichtbar. Ein Ausfallen des Farbstoffes konnte ich beim Arbeiten mit Sulfanilsäure und α-Naphthylamin in keinem Falle bemerken. Anscheinend war niemals so viel Nitrit in den Kulturen vorhanden, daß ein Ausfallen stattfinden konnte. Das Reagens von Riegler war in unserem Falle zu quantitativen Bestimmungen nicht zu gebrauchen; beim Zusatz des Ammoniaks, der ja hier notwendig ist, fiel sowohl bei Verwendung von Bakterienkulturen wie der reinen Nährlösung ein weißer Niederschlag aus, der den Farbstoff teilweise mit zu Boden riß. Der Niederschlag besteht wohl aus Magnesiumammoniumphosphat, das sich beim Zusatz von Ammoniak aus in der Nährlösung vorhandenem Magnesium und Phosphorsäure bildet.

Zum kolorimetrischen Vergleich wurde das von Donnan konstruierte Kolorimeter benutzt.

Dieses Kolorimeter erwies sich als sehr zweckmäßig, sowohl in bezug auf Genauigkeit der Resultate wie auch auf Schnelligkeit der Ausführung. Als Beleuchtungsquelle wurde die Meyersche Mikroskopierlampe mit Auerbrenner benutzt[1]), die eine sehr gleichmäßige Beleuchtung der beiden Zylinder gestattet. Als Normallösung, mit der die zu untersuchenden Kulturen verglichen wurden, diente eine solche, die in 1 ccm 0,01 mg N_2O_3 enthielt (vergl. Treadwell II. p. 255).

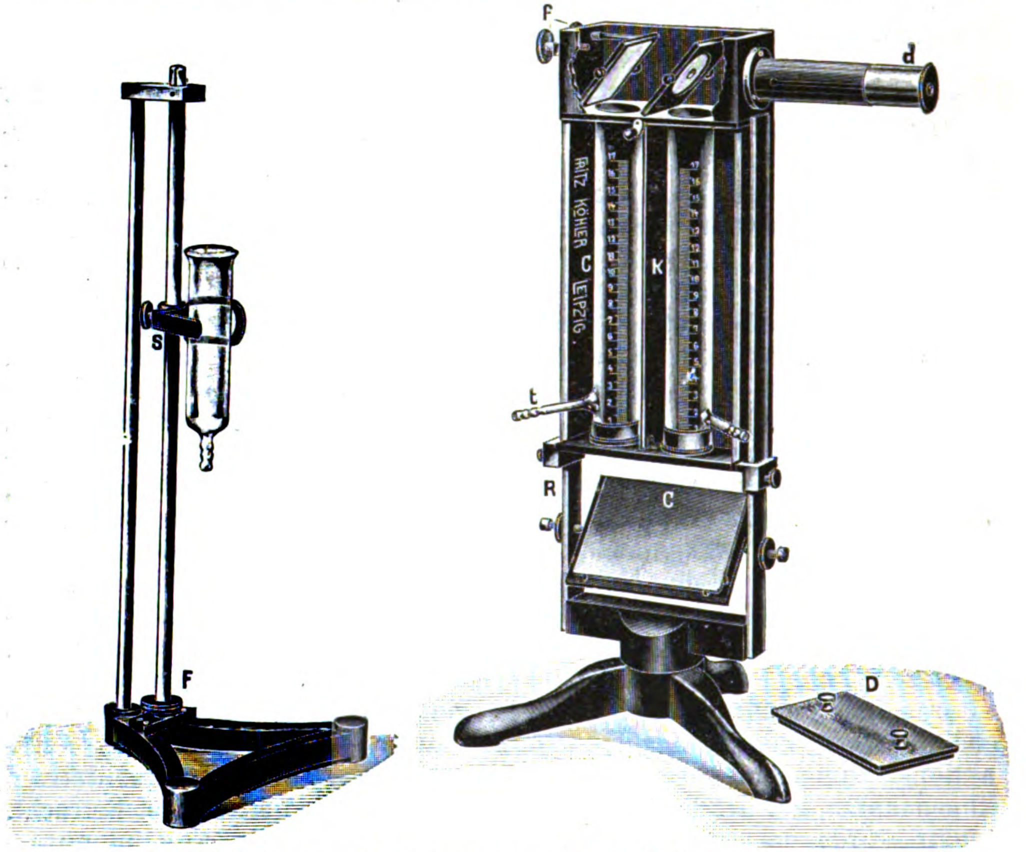


Fig. 3. Kolorimeter nach Donnan. Maximale Schichtdicke 170 mm.

Der Dreifuß trägt einen Metallrahmen R. In diesem ist der Lichtschutzkasten K mit Deckel befestigt. Die für die Aufnahme der Lösungen dienenden Glaszylinder C mit Tubus t sind mit Millimeter-Teilung sowie Planplatten mit Schraubenverschluß versehen. Zum Zwecke des bequemen Einsetzens der Zylinder ist der Boden, auf welchem dieselben stehen nach unten verschiebbar. Unten befindet sich der drehbare Beleuchtungsspiegel C (Milch- und Mattglas). Das mit dem Deckel D verschließbare Spiegelgehäuse trägt das verschiebbare Beobachtungsrohr d und die beiden durch die Schrauben f justierbaren Spiegelhalter, in welche die Spiegel eingeschoben werden. Zwischen Spiegel und Beobachtungsrohr befindet sich das Absorptionsgefäß (Glasgefäß mit planparallelen Wänden), das sich leicht herausnehmen läßt.

Die Ausführung der Bestimmungen gestaltete sich folgendermaßen: Ein Teil der auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Kultur wurde in ein Kölbchen gebracht, mit 1 ccm des aus Lösung I und II gerade gemischten Reagenses versetzt, mit nitritfreiem Wasser verdünnt und zum Sieden erhitzt.

---

[1]) Zu beziehen von W. H. Seibert in Wetzlar.

(Für die Darstellung des Reagenses siehe qualitativen Teil). Die Menge der Kultur, die zur Untersuchung kam, wurde so gewählt, daß ihr Gehalt an N_2O_3 etwas weniger betrug als der von 1 ccm der Normallösung, was durch einen Probeversuch ermittelt wurde. Diese Lösung wurde, nachdem sie sich abgekühlt hatte, in einen Zylinder des Kolorimeters gebracht. In den anderen Zylinder wurde eine genau so behandelte Lösung von genau bekanntem Nitritgehalt gebracht, deren Konzentration etwas stärker war als die der zu untersuchenden Lösung. Um Farbengleichheit zu erzielen, mußte also etwas von der Normallösung herausgelassen werden. Aus dem anfänglichen Stand der Normallösung und dem Stand bei Farbengleichheit ließ sich dann die Menge des in der zur Untersuchung gelangenden Flüssigkeit vorhandenen Nitrits leicht feststellen. Angenommen, das Volumen der Normallösung betrug anfangs 15 ccm, bis zur Farbengleichheit mit der Untersuchungsflüssigkeit mußten 5 ccm ausgelassen werden; dann ist in 10 ccm der Normallösung ebensoviel Nitrit enthalten wie in der zu prüfenden. Enthielt die Normallösung anfangs 0,01 mg, N_2O_3 so sind in einem bestimmten Volumen der Kultur $\frac{0{,}01 . 10}{15} = 0{,}007$ mg N_2O_3 enthalten. Aus dem Verhältnis der zur Untersuchung benutzten Menge zu der ganzen Kultur läßt sich dann leicht auf den Nitritgehalt der Kultur schließen.

Quantitative Bestimmung von Ammoniak.

Bei der quantitativen Bestimmung von Ammoniak in Bakterienkulturen liegen dieselben Schwierigkeiten vor wie beim qualitativen Nachweis, nämlich beim Austreiben eine Abspaltung nichtpräformierten Ammoniaks zu verhindern. Auf welche Weise sich dies am sichersten bewerkstelligen läßt, ist im qualitativen Teil (p. 369) ausführlich beschrieben. Die Bestimmung des übergetriebenen Ammoniaks ist sehr einfach. Sie kann kolorimetrisch mittels Neßlers Reagens erfolgen, noch bequemer aber ist es, das Ammoniak in eine gemessene Menge einer Normalsäure zu leiten und aus der Menge der durch das Ammoniak gebundenen Säure seine Menge zu berechnen. In unserem Falle war übrigens die Anwendung der kolorimetrischen Bestimmung nicht angängig, da, wie schon im qualitativen Teil bemerkt, die Nährlösung allein bei der Destillation mit Neßlers Reagens einen gelben Niederschlag gab.

Zum Austreiben des Ammoniaks aus den Kulturen wurde das von Folin (1902, 1903. p. 164) angegebene Ausblaseverfahren und Na_2CO_3 mit NaCl als Base benutzt. Für die Beschreibung des Verfahrens verweise ich auf die Arbeit von A. Viehöver (1913), von dem ich die Methode übernommen habe. Dort finden sich auch die einschlägigen Literaturhinweise. Diese Methode ist insofern vorteilhafter wie die Destillation im Vakuum, als sie gestattet, eine ganze Anzahl von Bestimmungen gleichzeitig zu machen, ohne daß die Apparate einer besonderen Überwachung bedürfen. Im Prinzip ist die Vakuumdestillation ebensogut zum Bestimmen des Ammoniaks in Bakterienkulturen geeignet. Es soll deshalb im folgenden auch eine Beschreibung dieser Methode gegeben werden. Von den vielen vorgeschlagenen Apparaten benutzte ich bei meinen Versuchen den von Krüger und Reich (1903 p. 170) mit geringfügigen Änderungen.

Der Apparat (vergl. dazu die Abbildung) setzt sich zusammen aus Destillationskolben, Vorlage und Manometer. Der Destillationskolben K ist ein 500 ccm fassender Kolben mit langem Hals, der während der Destillation in einem Wasserbad sich befindet. Er ist verschlossen mit einem doppelt durchbohrten Kautschukstopfen; durch die eine Bohrung führt eine rechtwinkelig gebogene Röhre a bis nahe auf den Boden des Gefäßes, die am äußeren Ende mit einem dickwandigen Kautschuckschlauch und Klemme q versehen ist. Sie kann nach Belieben an eine Schwefelsäure-Waschflasche angeschlossen oder zum Einsaugen von Alkohol benutzt werden. Die zweite Bohrung nimmt die zur Vorlage v führende Überleitungsröhre b auf. In der Wand dieser Röhre befindet sich bei l ein Loch, wodurch ein Übertreten von Blasen aus dem Kolben in das Rohr verhindert wird (vergl. Treadwell 1911). Als Vorlage dient eine Peligotsche Röhre von ca. 600 ccm Inhalt, von der in der Abbildung angegebenen Form. Sie befindet sich in einem Trog, durch den während der Destillation kaltes Wasser geleitet werden kann. Der erste Schenkel der Vorlage ist durch einen Kautschuckstopfen verschlossen durch dessen Bohrung die Überleitungsröhre b geht. Der zweite Schenkel ist ebenfalls mit einem Kautschuckstopfen versehen, durch dessen Bohrung ein Aufsatz c, wie er bei den Kjeldahlbestimmungen verwendet wird, geht. Er hat den Zweck, ein Überspritzen von Flüssigkeit zu verhindern. Das freie Ende des Aufsatzes ist durch einen dickwandigen Gummischlauch, der durch einen Quetschhahn q_2 verschlossen werden kann, mit einem Manometer verbunden, das seinerseits wieder an eine Wasserstrahlluftpumpe angeschlossen werden kann.

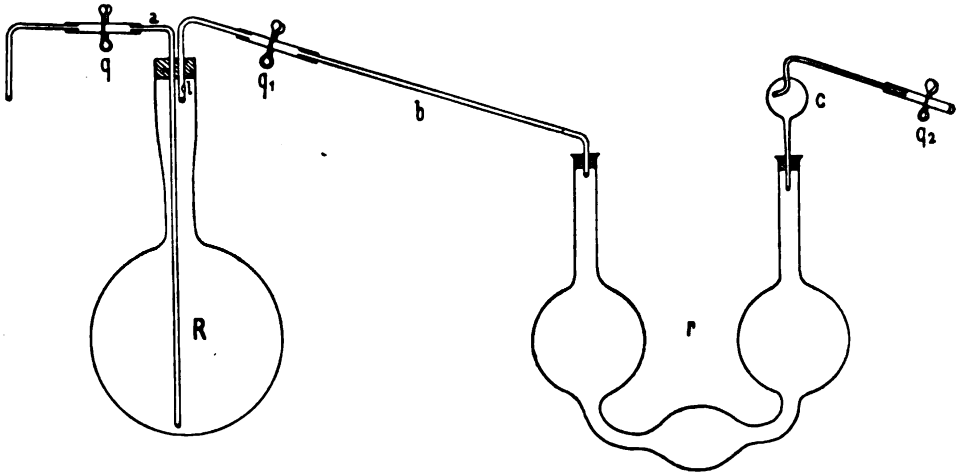


Fig. 4.

Zur Ausführung der Ammoniakbestimmung bringt man in den Destillationskolben die zu untersuchende Flüssigkeit, deren Volumen 50 ccm nicht überschreiten soll, fügt 10 g NaCl und 2 g Na_2CO_3 in fester Form, sowie 20 ccm Alkohol von 95 Proz. hinzu und verschließt den Kolben sofort. Die Quetschhähne q und q_1 werden ebenfalls geschlossen. (Der Alkohol verhindert ein Schäumen der Flüssigkeit, wie es besonders bei Gegenwart von Eiweißstoffen eintritt.)

Nachdem man in die Vorlage ein bestimmtes Volumen $^1/_{10}$ Normalsäure gebracht hat, wird der Apparat fertig zusammengesetzt und allmählich evakuiert, wozu Quetschhahn q_1 und q_2 vorsichtig geöffnet werden. Gleichzeitig kann man mit dem Anheizen des Wasserbades beginnen, dessen Temperatur 43° nicht übersteigen soll. Bei einer Temperatur von etwa 40° und einem Druck von etwa 20 mm beginnt ein lebhaftes Sieden, das man etwa 20'—30' fortsetzt. Nach Ablauf dieser Zeit ist alles Ammoniak, wenn es nicht in allzu großer Menge vorhanden ist, übergetrieben. Um die in der Röhre b und dem Kolbenhals sich absetzenden Wassertropfen zu beseitigen, umwickelt man den Kolbenhals mit einem heißen Tuch. Zum Schluß läßt man durch die Röhre a unter Öffnen des Quetschhahnes q 10 ccm Alkohol zufließen, die den Kolbeninhalt wieder zum lebhaften Sieden bringen und die in der Überleitungsröhre b sich befindenden Wassertropfen mit fortreißen. Nach Beendigung der Destillation schließt man zunächst den Quetschhahn q_2, sperrt die Wasserleitung ab und läßt durch die Röhre a Luft in Kolben und Vorlage eintreten, die man zunächst durch eine Schwefelsäurewaschflasche streichen läßt, um sie von Ammoniak zu befreien. Hierauf titriert man die nicht verbrauchte Säure in der Vorlage mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge und Alizarin als Indikator zurück. Jeder Kubikzentimeter verbrauchter Schwefelsäure entspricht 0,0017 mg Ammoniak.

Die Ausführung der Ammoniakbestimmung in den untersuchten Kulturen geschah in folgender Weise:

In das Reaktionsgefäß wurden 10 g Natriumchlorid und 2 g Na_2CO_3 in fester Form gebracht, 20 ccm der auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllten Kultur hinzugefügt, an die Vorlage, in der sich stets 4 ccm $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure befand, angeschlossen und ein mäßiger Luftstrom durchgesaugt. (Diese Menge der Säure genügte, um alles Ammoniak zu binden, auch wenn sämtliches den Bakterien gebotene Nitrat in Ammoniak umgewandelt gewesen wäre). Der Luftstrom passierte, um evtl. in der Luft vorhandenes Ammoniak unschädlich zu machen, ehe er in die Gefäße eintrat, eine Waschflasche mit konzentrierter Schwefelsäuse. Die Versuche wurden stets 6—7 Stunden fortgesetzt, in welcher Zeit immer alles Ammoniak in die Vorlagen übergetrieben war. Die nichtverbrauchte Säure wurde sodann mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge und Alizarin, in 1 Proz. alkoholischer Lösung als Indikator, bis zur Schwachrotfärbung zurücktitriert (der Indikator ist von Folin empfohlen und hat vor den gewöhnlich benutzten den Vorteil, daß er von mäßigen Mengen Ammoniak in seiner Wirksamkeit nicht behindert wird.) Aus der gefundenen Menge der verbrauchten Säure ließ sich dann leicht der Ammoniakgehalt der Kulturen ausrechnen, da 1 ccm $^1/_{10}$ n-Säure 0,0017 g NH_3 entspricht.

3. Kapitel.

Methode der Bakterienzählung.

Zum Zählen der Bakterien wurde die Methode des direkten Zählens unter dem Mikroskop benutzt. Die Methode ist von A. Viehöver praktisch durchgearbeitet worden. Für die Literaturangaben sowie alle anderen Fragen verweise ich auf dessen Arbeit (1913. p. 80). Ich führe nur an, wie die Zählungen bei meinen Versuchen ausgeführt wurden.

Als Zählkammer diente eine Kammer aus Glas von Zeis, die 0,1 mm tief war und 400 Quadrate von je $^1/_{400}$ qmm Inhalt enthielt. Das Volumen der über einem Quadrate stehenden Flüssigkeitssäule war also $^1/_{4000}$ cbmm. Zum Einfüllen der Flüssigkeit, in der die Bakterien gezählt werden sollten, wurde eine Schüttelpipette benutzt (vgl. A. Meyer, Grundlagen und Methoden für die mikroskopische Untersuchung von Pflanzenpulvern. Jena 1901. p. 126). Bei allen Zählungen war die Kammer mit einem plangeschliffenen Deckglas bedeckt. In der Regel wurde bei den Untersuchungen die Zahl der Stäbchen oder Sporen, die sich auf 200 Feldern befanden, festgestellt;

nachdem sich ergeben hatte, daß der Mittelwert davon dem einer Zählung von 400 Quadraten sehr nahe kam. Die Auswahl der zu zählenden Felder erfolgte nicht willkürlich, sondern es wurde zur Erzielung von gleichmäßigen Resultaten immer so verfahren, daß die beiden am weitesten rechts liegenden Felderreihen der Kammer zur Zählung benutzt wurden und bei den folgenden immer zwei Reihen übersprungen wurden.

Der für eine Zählung angegebene Wert ist immer das Mittel aus mindestens zwei Bestimmungen, wobei für jede die Kammer besonders gefüllt wurde. In einigen Fällen wurden auch 400 Felder gezählt oder der Mittelwert aus drei Zählungen festgestellt.

Das Zählen selbst geschah folgendermaßen:

Von der Lösung, in der die Zahl der vorhandenen Bakterien festgestellt werden sollte, wurde eine bestimmte Menge entnommen mit 2 oder mehr Kubikzentimeter einer 5—10-proz. Schwefelsäure versetzt und 1 ccm einer Methylenblau-Lösung 1 + 10 (ein Volumen einer gesättigten Lösung von Methylenblau in 95 Proz. Alkohol mit 10 Vol. keimfreien Wassers) hinzugefügt. Das Ganze wurde dann gründlich, mindestens 2 Minuten lang, gemischt, mit der Schüttelpipette etwas von der Flüssigkeit entnommen und ein kleiner Tropfen in die Zählkammer gebracht, so daß beim Auflegen des Deckglases nur das Volumen der Kammer gefüllt war, nicht aber auch noch Flüssigkeit zwischen Objektträger und Deckglas sich befand. Das Ganze wurde darauf in wagerechter Lage beiseite gelegt, bis die Bakterien sich zu Boden gesetzt hatten, was meist schon nach einer Viertelstunde geschehen war, und die Zahl der in 200 Feldern vorhandenen Sporen oder Stäbchen festgestellt. Die Zahl der in 1 ccm der ursprünglichen Lösung vorhandenen Bakterien berechnete sich dann wie folgt:

Befinden sich auf einem Felde beispielsweise zwei Stäbchen, so enthält also $^1/_{4000}$ ccm ebensoviel, und in 1 ccm sind dann $2 \times 4000 \times 1000 = 8\,000000$ Stäbchen vorhanden. Hierauf läßt sich dann leicht aus dem bekannten Gesamtvolumen der Kultur die ganze Menge der darin vorhandenen Bakterien berechnen.

Waren Stäbchen zu zählen, so wurde vor dem Schwefelsäurezusatz 1 ccm Kupferoxydammoniak zugefügt und dann, natürlich gut verschlossen, stehen gelassen, bis der Schleim sich gelöst hatte. Meist war dies nach einigen Stunden geschehen. Dann wurde in der vorher beschriebenen Weise weiter verfahren.

II. Teil.

Untersuchungen über die Nitratreduktion.

1. Kapitel.

Allgemeines über das Verhalten der Bakterien gegenüber Nitraten und Nitriten.

a) Allgemeines über das Verhalten der Bakterien gegen Nitrate.

Zu den Untersuchungen über das Verhalten unserer Bakterien Nitraten gegenüber wurde eine Nährlösung benutzt, die neben mineralischen Salzen nur ein Nitrat als Stickstoff- und ein Kohlehydrat als Kohlenstoffquelle enthielt, in der Zusammensetzung 0,2 g Kaliumnitrat, 1,0 g Dextrose, 100 g M.-Nährlösung. (Mit M.-Nährlösung ist hier, wie auch in allen folgenden Fällen, eine stickstoffreine mineralische Nährlösung bezeichnet, die sich zusammensetzt aus: 1 g KH_2PO_4, 0,1 g $CaCl_2$, 0,1 g NaCl, 0,3 g $MgSO_4$, 0,01 g Fl_2Cl_6 und 1000 g Leitungswasser. (Vergl. A. Meyer, Praktik der botan. Bakterienkunde 1903. p. 15). Die Nährlösung ist im folgenden kurz mit VIIγ bezeichnet, im Anschluß an die im Praktikum (p. 24) eingeführte Bezeichnungsweise. Die Art der einzelnen Bestandteile der Nährlösung sowie deren Konzentration hatte sich bei orientierenden Versuchen als praktisch herausgestellt.

Bei den Arbeiten über Nitratreduktion durch Bakterien wurden in manchen Fällen peptonhaltige Lösungen oder solche mit Bouillonzusatz benutzt. So verwendete Frankland (1889. p. 373) eine Lösung, die neben Calciumnitrat noch etwa 0,2 Proz. Pepton enthielt, Dieudonné (1895. p. 508) gebrauchte 1 Proz. Peptonwasser mit 0,01, 0,001 und 0,0001 Calciumnitrat, Maassen (1902. p. 28), wenigstens zu der Mehrzahl seiner Versuche, 5 Proz. Peptonlösung mit 0,5 Proz. Kaliumnitrat, Severin (1902. p. 750) Peptonbouillon mit 0,3 Proz. Kaliumnitrat, Gredig (1906. p. 82) Bouillon und auch Peptonwasser mit Nitratzusatz. Derartig zusammengesetzte Lösungen, die neben dem Nitrat noch eine andere organische Stickstoffverbindung enthalten, sind aber für die Untersuchungen über die Reduktion der Nitrate aus mehreren Gründen wenig geeignet. Einmal ist es nicht möglich, einwandfrei festzustellen, woher das in solchen Lösungen gebildete Ammoniak stammt. Es kann ebensowohl von dem Nitrat, wie von dem Pepton herrühren, da sehr viele Bakterien die Fähigkeit haben, das Pepton bis zum Ammoniak abzubauen. Zwar ist man, wie Maassen (1902. p. 40) sagt, nach den bisherigen Ermittlungen im allgemeinen zu der Annahme berechtigt, daß in den Fällen, wo ohne Gasentwicklung (Schaumbildung) ein vollständiges Verschwinden der Nitrate eintritt, das Endprodukt der Reduktion Ammoniak ist, allein die wenigsten Bakterien vermögen das Nitrat in den Mengen, wie es ihnen gewöhnlich geboten wird, vollständig zu reduzieren, so daß man für den Nachweis der Nitratreduktion fast ganz auf die Nitritbildung angewiesen ist. Ferner kann man bei Benutzung von Peptonlösungen, wenn man nicht gerade quantitative Bestimmungen macht, niemals sagen, inwieweit das Nitrat den Bakterien zur Nahrung dient, da die Menge des gebildeten Nitrits durchaus kein Maß hierfür abgibt. Aus allen diesen Gründen ist es zweckmäßig, bei den Untersuchungen über nitratreduzierende Bakterien einen Peptonzusatz zu den Nährlösungen möglichst zu vermeiden und mit Nährlösungen in der Art von VIIγ oder ähnlich zusammengesetzten, wie sie beispielsweise von Heraeus, Marchal, Fichtenholz und Stoklasa und Vítek benutzt wurden, zu arbeiten, da bei diesen die genannten Schwierigkeiten ohne weiteres wegfallen. In einzelnen Fällen ist es allerdings nicht möglich, ohne Peptonzusatz auszukommen, da manche Bakterien in den obengenannten Lösungen kein Wachstum zeigen. Auch in unserem Falle war das bei mehreren der Fall, nämlich bei B. calidus, B. cohaerens, B. alvei, B. mycoides, B. robur, B. robustus, B. sphaericus und B. tostus. Trotz mehrfachen Impfens waren sie in VIIγ nicht zum Wachstum zu bringen, auch nicht, wenn die Konzentration des Nitrats nur 0,05 Proz. betrug, so daß man annehmen muß, daß diese Bakterien unter den gegebenen Umständen den Nitratstickstoff nicht auszunützen vermögen. Damit stimmt auch überein, daß sie nach den Untersuchungen von Gottheil und Blau in Nährlösung VII (1,0 KNO_3, 0,5 Rohrzucker, 1,0 Glyzerin, 100,0 M.-Nährlösung) keine Entwicklung zeigen, mit Ausnahme von B. robur und B. alvei, für die Neide ein ganz geringes Wachstum angibt. Ich selbst konnte trotz mehrfacher Versuche auch für diese beiden Spezies in der Nährlösung VII keinerlei Entwicklung feststellen. Da die genannten 8 Bakterien in Peptonlösungen gut wachsen, so wurde, um sie überhaupt auf Nitratreduktion prüfen zu können, für sie noch ein Peptonzusatz von 1 Proz. zu der Lösung VII γ gemacht, so daß also diese Nährlösung 1,0 Dextrose, 0,2 Kaliumnitrat, 1,0 Pepton und 100,0 M-Nährlösung enthielt. Sie ist im folgenden kurz mit VII ε bezeichnet. Bei den hierin untersuchten Bakterien wurde nur auf Nitritbildung geprüft, die Frage ob Ammoniak gebildet wird, wurde offen gelassen. Als Kulturgefäße wurden Erlenmeyerkölbchen aus Jenaer Glas, von ca. 200 ccm Inhalt, benutzt. Sie hatten eine Höhe von etwa 9 cm, einen ganz flachen Boden von 7,5 cm Durchmesser und liefen nach oben spitz zu, so daß die Öffnung des Kölbchens einen Durchmesser von etwa 2,5 cm hatte. Diese Form des Kölbchens wurde gewählt, um den Bakterien Sauerstoff in reichem Maße zu bieten. Die Nährlösungen wurden fertig gemischt, filtriert, in Mengen von 50 ccm in die Kölbchen eingefüllt und durch dreimaliges Erhitzen von je ½ Stunde im Dampftopf an 3 aufeinanderfolgenden Tagen steril gemacht. Es sei hier bemerkt, daß sämtliche Abmessungen, dem Zwecke dieses Versuchs entsprechend, nur qualitativ genau sind. Beide Nährlösungen waren ganz klar, VIIγ leicht gelblich, VIIε gelb gefärbt und reagierten für blaues Lakmuspapier schwach sauer. (Zur Prüfung auf sauere und alkalische Reaktion wurde hier, wie in allen Fällen, wo es nicht besonders angegeben ist, das sehr empfindliche Lakmuspapier der chemischen Fabrik Helfenberg A.-G. in Helfenberg bei Dresden, einseitig Postpapier, benutzt.) Beim Impfen wurde darauf geachtet, daß bei derselben Spezies immer gleiche Mengen Impfmaterial genommen wurden, um eine einigermaßen gleiche Entwicklung zu erzielen. Als solches wurden immer zwei Ösen voll eines Gemisches von Stäbchen und Sporenmaterial verwendet, doch bei den Spezies, deren Sporen nicht in der Nährlösung keimten (es war dies bei denen der Fall, deren Wachstum in den Tabellen als schwach bezeichnet ist), wurde gut schwimmendes Stäbchenmaterial verwendet. Zum Impfen wurden immer Reinkulturen benutzt, die in Kulturröhrchen auf D-Agar gewachsen waren. In keinem Falle wurde aus einem Kölbchen in das andere übergeimpft. Bei sämtlichen Versuchen wurden die Bakterien bei gewöhnlichem Luftdruck und der optimalen Temperatur gezüchtet, die gewöhnlichen also bei 28° C, die thermophilen (es sind dies B. calidus, B. cylindricus, B. robustus und B. tostus) bei 60° C. Untersucht wurde auf Wachstum, Reaktion und Nitritbildung nach 3, 7 und 14 Tagen, auf Ammoniakbildung nach 7 und 14 Tagen, Einige von den Bakterien wurden auch nach einer Entwicklungsdauer von 3 Monaten geprüft. Für die Wahl dieser Zeitpunkte war die Wachstumsintensität der Bakterien maßgebend. Gewöhnlich begann die erste sichtbare Entwicklung am zweiten Tage nach dem Impfen und hatte nach etwa 7 Tagen bei allen Spezies ihren Höhepunkt erreicht. Darüber hinaus war eine Änderung in dem Aussehen der Kulturen nicht mehr zu bemerken. Die Untersuchung nach 3 und 7 Tagen gibt Aufschluß darüber, wie sich die Bakterien während ihres Hauptwachstums den Nitraten gegenüber verhalten. Eine einmalige Untersuchung, wie sie von den meisten Forschern, die sich mit Nitratreduktion beschäftigten, ausgeführt wurde, kann das Verhalten der Bakterien nicht erschöpfend kennzeichnen, da dieses während des Hauptentwicklungsstadiums oft ganz anders ist als nach mehrwöchentlichem Stehen. Hiermit hängt auch wohl zusammen, daß beispielsweise Franzen und Löhmann (1909 p. 99) bei der Untersuchung von mehreren Bakterien, die auch schon Maassen geprüft hatte, ein anderes Verhalten fanden, als dieser. Maassen untersuchte alle seine Bakterien erst nach vierwöchentlicher Entwicklung, während Löhmann und Franzen spätestens nach 5 Tagen ihre Bestimmungen anstellten. Über das Verfahren beim Nitrat-, Nitrit- und Ammoniaknachweis ist ausführlich in dem Kapitel „Methoden" gesprochen. Es sei hier nur erwähnt, wie die einzelnen Angaben über die Menge der vorhandenen Stoffe aufzufassen sind. Wie schon oben angeführt, bezieht sich der Nachweis des Nitrats und Nitrits immer auf 1 ccm der unverdünnten Kultur, die mit derselben Menge Reagens versetzt wurde. Bei Nitrat war die entstehende Färbung immer so stark, daß Intensitätsunterschiede nicht festgestellt werden konnten. Bei Nitrit bedeutet „sehr stark vorhanden": die Farbe der mit dem Reagens versetzten Kultur wurde sofort dunkelrot, „stark": sie wurde langsamer rot, „schwach": sie wurde hellrot und „andeutungsweise": es zeigte sich ein rötlicher Farbton. Bei Ammoniak beziehen sich die gegebenen Daten immer auf 2—3 ccm der destillierten Kultur, die mit 5—10 Tropfen des Reagens versetzt wurde. Die Bezeichnung „sehr stark" bedeutet, daß sofort nach dem Zusatz des Reagenses sich ein dicker, brauner Niederschlag bildete, „stark", daß sich erst nach einigem Stehen ein Niederschlag absetzte und „schwach", daß erst nach längerer Zeit ein geringer Bodensatz entstand.

Es seien nun zunächst die Resultate aufgeführt, die mit den in Nährlösung VII γ wachsenden Bakterien, im ganzen 20 Spezies, erzielt wurden. Die Zusammenstellung ist zur besseren Übersicht in Form einer Tabelle gegeben (s. p. 384—387).

Aus den in der Tabelle zusammengestellten Resultaten ergibt sich zunächst, daß für die meisten Bakterien Nährlösung VIIγ eine gute Nährquelle ist. Nur B. asterosporus, B. Ellenbachensis, B. fusiformis, B. lacticola, B. pumilus und B. teres kommen schlecht darin vorwärts. Unter den gegebenen Bedingungen kann also der Stickstoff des Nitrats von den letztgenannten Bakterien schlecht ausgenutzt werden. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben, die Gottheil, Neide, Garbowski und Vahle über das Verhalten der Spezies in Nährlösung VII machen, ziemlich gut überein. Nur war hier im allgemeinen das Wachstum viel schwächer, was sicherlich mit der hohen Nitratkonzentration (1 Proz.) der benutzten Nährlösung zusammenhängt.

Die Fähigkeit, während des Wachstums Nitrit aufzuspeichern, kam 12 Spezies zu, nämlich B. asterosporus, B. carotarum, B. cylindricus, B. Ellenbachensis, B. fusiformis, B. lactis, B. lacticola, B. parvus, B. pumilus, B. simplex, B. subtilis und B. teres. Die Menge des aufgespeicherten Nitrits war aber sehr verschieden bei den einzelnen Spezies. Bei den 8 nicht genannten Bakterien konnte Nitrit in keinem Stadium der Entwicklung, auch nicht in Spuren, nachgewiesen werden. Die Eigenschaft, Nitrit aufzuspeichern, hängt also nicht mit dem Wachstum zusammen, da bei Bakterien, die in der Nährlösung nur schwach wachsen, z. B. bei B. asterosporus und B. Ellenbachensis, eine starke Nitritreaktion eintritt, während bei sehr stark wachsenden, z. B. tumescens und B. Petasites u. a. die Untersuchung auf Nitrite ganz negativ ausfällt.

Ammoniak wurde während der Hauptentwicklungszeit von 13 Spezies aufgespeichert, nämlich: B. asterosporus, B. carotarum, B. cylindricus, B. Ellenbachensis, B. graveolens, B. lactis, B. oxalaticus, B. parvus, B. pumilus, B. sim-

Tabelle über das Verhalten der in Nährlösung

Lfd. No.	Name des Bacillus	Nährlösung	Wachstumsintensität nach zweiwöchentlicher Entwicklung	Reaktion der Nährlösung nach einer Entwicklung von			Aussehen der Nährlösung nach vierwöchentlicher Entwicklung
				3 Tagen	8 Tagen	14 Tagen	
1	B. asterosporus	VII γ	schwach	schwach sauer	neutral	neutral	Nährlösung ist unverändert u. Trübung kaum sichtbar
2	B. carotarum	VII γ	ziemlich stark	neutral	neutral	neutral	Kultur gelb-weiß, zieml. stark getrübt
3	B. cylindricus	VII γ	nach 8 Tagen mittelstark	schwach sauer	neutral	—	Nach 8 Tagen gelb aussehend, aber nicht sehr stark durch die Bakterien getrübt
4	B. Ellenbachensis	VII γ	schwach	neutral-schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer	Unverändert, sehr geringe Trübung
5	B. fusiformis	VII γ	schwach	schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer	Farbe unverändert, sehr geringe, fast unmerkliche Trübung
6	B. graveolens	VII γ	sehr stark	schwach sauer	sauer	sauer	Farbe weißlich, von großen Bakterienmassen ganz undurchsichtig
7	B. lactis	VII γ	mittelstark	schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer-neutral	Lösung weißlich, schwach getrübt von flüssigen Bakterienmassen
8	B. lacticola	VII γ	schwach	neutral	—	schwach sauer	Farbe etwas gelblich, sehr geringe Trübung
9	B. luteus	VII γ	sehr stark	schwach sauer	neutral	schwach alkalisch	Farbe gelblich, Trübung sehr stark
10	B. megatherium	VII γ	stark	schwach sauer	schwach sauer	sauer	Kultur von weißl. Farbe, stark getrübt, aber nicht so stark wie Petasites
11	B. oxalaticus	VII γ	sehr stark	schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer	Farbe graugelb, von flockigen Bakterienmassen ganz trüb

VII γ wachsenden Bakterien gegen Nitrate.

Aufspeicherung von Nitrit nach einer Entwicklungsdauer von			Aufspeicherung von Ammoniak nach einer Entwicklungsdauer von		Ist noch Nitrat vorhanden nach einer Entwicklungsdauer von		Bemerkungen
3 Tagen	8 Tagen	14 Tagen	8 Tagen	14 Tagen	14 Tagen	3 Monaten	
sehr stark	**sehr stark**	**sehr stark**	**schwach**	**ziemlich stark**	—	**stark vorhanden**	**Nach 3 Mon. wie B. simplex; R. schwach alkalisch;** Nitrit sehr stark
stark	schwach	sehr schwach	—	schwach	sehr stark	—	—
sehr stark	—	—	—	—	nach 8 Tg. Nitr. nicht mehr vorh.	—	B. cylindricus zerstört das Nitrat unter Gasentwickl., also wahrscheinlich zu Stickstoff
sehr stark	sehr stark	sehr stark	schwach	schwach	sehr stark	—	—
schwach	schwach	schwach	—	—	sehr stark	—	—
—	—	—	sehr stark	sehr stark	Nitrat noch stark vorhanden	Nitrat noch ziemlich stark	Nach 3 M. dicker gelbl. Bodensatz, Lösung gelb.; R. schwach alkalisch, Nitrit sehr schw., Ammon. sehr stark vorhanden
schwach	stark	schwach	ganz schwach	ziemlich stark	—	sehr stark vorhanden	Nach 3 Monaten geringer, feinkörniger Bodensatz; Nitrit andeutungsweise; Ammoniak schwach; R. schwach sauer
mittelstark	schwach	sehr schwach	—	—	sehr stark	—	—
—	—	—	—	stark	sehr stark	—	Nach 3 und 4 Wochen R. alkalisch; Nitrat nicht vorhanden; Ammoniak stark vorhanden
—	—	—	—	—	sehr stark	—	—
—	—	—	sehr stark	stark	nach 4 Wochen starke Nitratreaktion	stark	Nach 3 Monaten Wachstum wie nach 14 Tagen, Nitrit u. Ammoniak sehr stark, Reaktion schwach alkalisch

Tabelle über das Verhalten der in Nährlösung VII γ

Lfd. No.	Name des Bacillus	Nähr-lösung	Wachstums-intensität nach zweiwöchentlicher Entwicklung	Reaktion der Nährlösung nach einer Entwicklung von 3 Tagen	8 Tagen	14 Tagen	Aussehen der Nährlösung nach vierwöchentlicher Entwicklung
12	B. parvus	VII γ	sehr stark	schwach sauer	schwach sauer	schwach alkalisch	Kultur dick braungelb, ganz undurchsichtig
13	B. petasites	VII γ	sehr stark	schwach sauer	schwach sauer	alkalisch	Farbe gelbbraun, d. d. großen Massen von Bakterien ganz undurchsichtig
14	B. pumilus	VII γ	schwach	neutral	schwach sauer	neutral	Unverändert, sehr geringe Trübung
15	B. ruminatus	VII γ	mittelstark	schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer	Gelbl.-weiße stark getr. Flüssigkeit
16	B. silvaticus	VII γ	sehr stark	schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer	Dicke bräunl.-gelbe Flüssigkeit mit gr. Bakterienmassen
17	B. simplex	VII γ	mittelstark	schwach sauer	schwach sauer	neutral	Farbe gelbl., Lösung schwach getrübt
18	B. subtilis	VII γ	sehr stark	neutral	schwach sauer	schwach sauer	Farbe braun, große Bakterienmassen, die die Flüssigkeit undurchsichtig machen
19	B. teres	VII γ	schwach	schwach sauer	schwach sauer	schwach sauer	Farbe bräunl.-gelb, von Bakterien sehr geringe Trübung
20	B. tumescens	VII γ	sehr stark	schwach sauer	schwach sauer	sauer	Farbe graugelb, große Bakterienmassen; ganz undurchsichtig

plex, B. subtilis, B. teres und B. tumescens. Die Menge des vorhandenen Ammoniaks ist bei den einzelnen Spezies sehr verschieden; bei einer sehr stark, bei anderen schwach. Ebenso wie beim Nitrit ist auch die Fähigkeit der Ammoniakaufspeicherung nicht mit der Intensität des Wachstums verbunden. Eine Erklärung dafür, womit die Nitrit- und Ammoniak-

wachsenden Bakterien gegen Nitrate (Fortsetzung).

Aufspeicherung von Nitrit nach einer Entwicklungsdauer von			Aufspeicherung von Ammoniak nach einer Entwicklungsdauer von		Ist noch Nitrat vorhanden nach einer Entwicklungsdauer von		Bemerkungen
3 Tagen	8 Tagen	14 Tagen	8 Tagen	14 Tagen	14 Tagen	3 Monaten	
stark	stark	stark	stark	stark	sehr stark	—	—
—	—	—	—	sehr stark	Nitrat noch stark vorhanden	—	—
schwach	sehr schwach	sehr schwach	—	schwach	—	—	—
—	—	—	—	—	stark vorhanden	—	—
—	—	—	vielleicht vorhanden aber wegen des gelben Niederschlags nicht zu erkennen		nach 4 Wochen noch stark vorhanden	stark vorhanden	Nach 3 Monaten W. wie bei B. graveolens, Nitrat andeutungsweise, Ammoniak sehr stark; R. schwach alkalisch
stark	stark	stark	schwach	schwach	—	stark vorhanden	3 Monate W. schwach; geringer Bodensatz; R. schwach sauer, Nitrat und Ammoniak stark
stark	stark	schwach	stark	stark	mehrmals ganz verbraucht einmal sogar nach 8 Tagen	alles verschw., ebenso Nitrit	Nach 3 Monaten gelber Bodensatz, Flüssigkeit braun; Ammoniak sehr stark; Reaktion neutral. Bei 0,5 % KNO_3 ist Nitrat sehr stark vorhanden
stark	stark	stark	schwach	stark	—	sehr stark vorhanden	Nach 3 Mon. ger. Wachstum, Trübung gering, Ammoniak stark, Nitrit andeutungsweise; R. schwach sauer
—	—	—	sehr stark	sehr stark	noch stark vorhanden	ziemlich stark	Nach 3 Mon. Wachstum wie B. graveolens; R. schwach alkalisch, Nitrat ziemlich stark; Ammoniak sehr stark

aufspeicherung wahrscheinlich zusammenhängt, wird in einem späteren Teil (s. Kapitel über Einfluß der Reaktion und Kapitel über den Verlauf der Nitratreduktion) gegeben. Dem Ammoniaknachweis stellten sich manchmal Schwierigkeiten entgegen, da der gelbe Niederschlag, den das Neßlersche Reagens, wie schon früher bemerkt, mit dem Destillat der reinen Nährlösung gab, oft so stark war, daß er den braunen Ammoniakniederschlag fast verdeckte. Besonders stark war das bei B. asterosporus der Fall. Jedoch war es nach einiger Übung nicht schwer, die vom Ammoniak herrührende Fällung zu erkennen, so daß die gegebenen Daten unbedingt zuverlässig sind.

Im allgemeinen herrscht in der Kultur die sauere Reaktion vor. Es hängt dies mit der benutzten Kohlenstoffquelle, der Dextrose, zusammen, die von den Bakterien unter Säurebildung gespalten wird, wobei die gebildete Säure das durch Zersetzung der Nitrate gebildete Alkali augenscheinlich überwog. Am stärksten ist diese Säurereaktion bei Bac. tumescens und B. oxalaticus, wo in den ersten 14 Tagen der Entwicklung auch die großen Mengen Ammoniak nicht genügen, um die gebildete Säure vollkommen zu neutralisieren. Bei den 3 Monate alten Kulturen ist allerdings die Reaktion alkalisch geworden. Diese Erscheinung, daß in den älteren Stadien des Wachstums die früher sauere Reaktion in eine alkalische umschlug, machte sich auch bei anderen Bakterien geltend.

Das Nitrat, obgleich es nur in Mengen von 0,2 Proz. zugegen war, konnte von keinem der Bakterien, mit Ausnahme von Bac. cylindricus und B. subtilis, aufgebraucht werden. Bei dem erstgenannten scheint diese vollständige Nitratzersetzung auf Denitrifikation zu beruhen. Bei B. subtilis wird das Nitrat, wie quantitative Untersuchungen zeigten, in Ammoniak umgewandelt. Bei allen anderen Bakterien fiel die Nitratreaktion auch nach 3-monatlichem Wachstum immer so stark aus, daß Intensitätsunterschiede nicht zu bemerken waren. Die Tatsache, daß bei der Nitratreduktion das salpetersaure Salz fast niemals ganz verbraucht wird, ist auch von anderen Forschern festgestellt worden. So z. B. von Maassen: Der in 5 Proz. Peptonlösung in einer Menge von 0,5 Proz. vorhandene Salpeter wurde nur von wenigen salpeterreduzierenden Bakterien ganz aufgebraucht, und auch dann erst nach längerem Wachstum. Franzen und Löhmann haben bei quantitativen Versuchen gefunden, daß in Kulturen mit 1 Proz. Kaliumnitrat meist 30—70 Proz. nach 5-tägigem Wachstum zerstört waren. Stoklasa und Vítek haben bei der Untersuchung einer großen Zahl von Bakterien, darunter B. subtilis, B. Megatherium und B. mycoides, ähnliche Resultate wie Franzen und Löhmann erhalten. In Kulturen mit 2 Proz. Natriumnitrat war nach 30—40-tägigem Wachstum, meist etwa 70 Proz. des Nitrats verschwunden. Quantitative Untersuchungen über die Menge des verschwundenen Nitrates wurden in unserem Fall nur mit einigen Bakterien angestellt (s. später). Auch hier zeigte sich, daß die Bakterien von dem zugesetzten Nitrat, nachdem die Höhe des Wachstums erreicht war, nur einen Bruchteil, etwa 30 Proz., verzehrt hatten.

Im einzelnen ist über die verschiedenen Bakterien folgendes zu sagen:

B. asterosporus. Das Wachstum in der Nährlösung ist schwach. Nach 14-tägiger Entwicklung ist eine geringe, kaum sichtbare Trübung der Nährlösung festzustellen. Die Nitritbildung ist im Vergleich zum Wachstum sehr stark. Ammoniak läßt sich nur schwer nachweisen, da immer ein gelbschwarzer Niederschlag mit ausfällt. Die anfangs neutrale Reaktion der Nährlösung ist nach 3 Monaten schwach alkalisch, dabei Geruch wie nach saurer Milch vorhanden. Chester und Vahle, die ebenfalls B. asterosporus auf Nitratreduktion untersuchten, fanden auch starke Nitritbildung.

B. carotarum. Das Wachstum ist ziemlich stark. Die Kultur nach 14 Tagen von gelblicher Farbe und ziemlich getrübt. Nitrit und Ammoniakbildung schwach. B. carotarum vermag anscheinend das Nitrat ziemlich gut als Stickstoffquelle zu verwerten.

B. Ellenbachensis. Der Bacillus zeigt in seinem Verhalten große Ähnlichkeit mit B. asterosporus. Er wächst, wie dieser, schwach in der Nährlösung, bildet viel Nitrit und wenig Ammoniak. Nur die Reaktion ist hier schwach sauer, während sie bei B. asterosporus neutral ist. Mit meinen Beobachtungen stimmen die von Stutzer überein. Auch er fand, daß dem B. Ellenbachensis ein starkes Nitratreduktionsvermögen zukommt, wobei neben viel Nitrit auch Ammoniak gebildet wird.

B. fusiformis. Im Wachstum zeigt B. fusiformis eine große Ähnlichkeit mit B. Ellenbachensis und B. asterosporus, indem auch hier die Farbe der Nährlösung unverändert bleibt und das stattgefundene Wachstum nur in einer sehr geringen Trübung zu bemerken ist. Er bildet aber, im Gegensatz zu den genannten Bakterien, nur wenig Nitrit und kein Ammoniak, nur einmal konnten ganz geringe Mengen festgestellt werden. Chester, der 1904 eine Kultur von B. fusiformis untersuchte, gibt an, daß er keine Nitritbildung feststellen konnte.

B. graveolens. B. graveolens wächst sehr stark in der Nährlösung. Die Kultur ist nach 14-tägiger Entwicklung von weißlicher Farbe und durch große Bakterienmassen stark getrübt. Nitrit war niemals nachzuweisen, wenigstens nicht in den ersten Entwicklungsstadien; Ammoniak dagegen in sehr starkem Maße vorhanden. Das Nitrat wurde aber trotz der starken Entwicklung niemals ganz aufgezehrt. Nach 3 Monate langem Stehen hatte sich eine Reaktionsänderung vollzogen. Zugleich waren denn auch geringe Mengen Nitrit nachzuweisen. Der Bacillus stimmt in seinem Verhalten fast vollkommen mit B. tumescens, mit dem er ja auch sehr nahe verwandt, wenn nicht identisch ist, überein.

B. lactis. B. lactis wächst nicht sonderlich gut in Nährlösung VII γ. Nach 14 Tagen ist die Farbe der Lösung weiß, und eine geringe Trübung, die von flockigen Bakterienmassen herrührt, vorhanden. Nitrit und Ammoniak werden nur in geringem Maße aufgespeichert. Nach 3 Monate langem Stehen hatte sich die Kultur in keiner Weise verändert.

B. lacticola. Dieser, dem vorhergenannten nahestehende Bacillus zeigt noch schwächeres Wachstum. Die Kultur ist nach 14 Tagen etwas gelblich gefärbt, aber nur wenig getrübt. Nitrit wird nur schwach aufgespeichert, Ammoniak überhaupt nicht; dem B. lacticola kommt unter diesen Umständen nur ein sehr geringes Nitratzerstörungsvermögen zu.

B. luteus. Bacillus luteus wächst von den untersuchten Bakterien mit am stärksten in VII γ. Die Kultur ist nach 14 Tagen deutlich gelb gefärbt, dabei von großen Bakterienmassen ganz trübe. Hinsichtlich seines Verhaltens Nitraten gegenüber unterscheidet er sich von allen anderen untersuchten Bakterien.

Die anfangs schwachsaure Lösung wird bald neutral, nach 14 Tagen schwach alkalisch und behält diese alkalische Reaktion auch nach 3- und 4-wöchentlichem Wachstum bei. Dabei ist Nitrit nicht nachzuweisen, was sonst bei alkalischer Reaktion die Regel ist, wohl aber viel Ammoniak, das sich sonst fast nur bei neutraler oder saurer Reaktion findet. Das Nitrat wird nicht völlig aufgezehrt. Nach 4-wöchentlichem Wachstum tritt mit Diphenylamin noch eine starkblaue Färbung ein. Sporen vermag B. luteus in der Nährlösung nicht zu bilden.

B. megatherium. Dieser Bacillus wächst stark in Nährlösung VIIγ, allerdings nicht in dem Maße, wie beispielsweise B. luteus oder B. tumescens. Die Kultur ist von weißlicher Farbe und stark getrübt. Nitrit oder Ammoniakaufspeicherung fand sich nicht; auch nicht in 3 oder 4 Wochen alten Kulturen. Die Nitratreaktion war nach 14-tägigem Wachstum noch sehr stark.

B. oxalaticus. Das Wachstum ist sehr stark. Nach 14-tägiger Entwicklung ist die Farbe der Nährlösung grau-gelb, die Kultur von großen Bakterienmassen erfüllt. Nitrit ist in keinem Stadium der Entwicklung nachzuweisen, dagegen ist Ammoniak immer sehr stark vorhanden. Die Reaktion ist immer sauer, nach 3 Monate langem Stehen ist sie in die alkalische umgeschlagen. Nitrat ist sowohl nach 4 Wochen wie nach 3 Monaten noch stark vorhanden. Sporen werden nicht in der Lösung gebildet. Vahle[1]), der den Bac. in Lösung VII ebenfalls auf Nitritbildung untersucht hat, konnte mit Zinkjodidstärkekleister kein solche nachweisen.

B. oxalaticus ist in seinem Verhalten dem B. tumescens und B. graveolens vollkommen gleich, obgleich er sonst sich stark von beiden unterscheidet.

B. parvus. B. parvus gehört zu den in Nährlösung VIIγ stark wachsenden Bakterien. Die Kultur zeigt nach 14-tägiger Entwicklung eine gelb-braune Farbe und ist von großen Bakterienmassen erfüllt. Nitrit und Ammoniak werden in starkem Maße aufgespeichert, wodurch der Bac. eine gewisse Ähnlichkeit mit B. subtilis hat. Die Nitratreaktion war nach 14 Tagen noch sehr stark.

B. Petasites: B. Petasites zeigt in Nährlösung VII γ von allen untersuchten Bakterien das stärkste Wachstum. Die Kultur ist nach 14 Tagen ganz undurchsichtig und zeigt eine gelbbraune Farbe. Nitrit wird in keinem Stadium der Entwicklung von B. Petasites aufgespeichert. Im Anfang ist ebenfalls kein Ammoniak nachzuweisen, nach etwa 14 Tagen ist es aber in großer Menge vorhanden. Da nach ungefähr einer Woche die Höhe der Entwicklung erreicht ist, wird diese Ammoniakbildung wohl eher von einem Enzym als von dem Wachtumsprozeß des Bakteriums hervorgerufen sein. Die Nitratreaktion war nach 14-tägigem Wachstum noch sehr stark.

B. pumilus. Wachstum nur sehr schwach. Die Farbe der Nährlösung ist nach 14-tägiger Entwicklung unverändert; eine sehr geringe Trübung zeigt das stattgefundene Wachstum an. Nitrit- und Ammoniakaufspeicherung kommt den Bazillen unter den gegebenen Bedingungen nur in geringem Maße zu.

B. ruminatus. Dieser Bacillus wächst etwas besser als der vorhergenannte in der Nährlösung. Die Lösung ist ziemlich stark getrübt und von gelblich-weißer Farbe. Nitrit und Ammoniak ließen sich in keinem Stadium der Entwicklung nachweisen. Das Destillat für den Ammoniaknachweis gab mit Neßlers Reagens immer einen dicken, gelben Niederschlag, wodurch es unmöglich war, ev. vorhandenes Ammoniak zu erkennen. Es ist aber nicht wahrscheinlich, daß solches aufgespeichert wird. Chester konnte auch für B. ruminatus keine Nitritbildung feststellen.

B. silvaticus. B. silvaticus vermag unter den gegebenen Bedingungen den Nitratstickstoff sehr gut auszunutzen. Das Wachstum ist intensiv; die Kultur stellt eine braungelbe, stark getrübte Flüssigkeit dar.

---

[1]) Vahle, 1909. p. 48.

Nitrit und Ammoniak ließen sich bis zu einem Wachstum von 4 Wochen niemals nachweisen. Ähnlich wie bei Bac. ruminatus gab auch hier das Destillat mit Neßlers Reagens einen dicken, gelben Niederschlag, der aber nach einwöchentlichem Wachstum kein Ammoniak enthielt, wie eine Bestimmung, die nach der quantitativen Art ausgeführt wurde, ergab. Es ist aber möglich, daß in den älteren Kulturen Ammoniak vorhanden war. Jedenfalls ließ sich in 3 Monate alten Kulturen Ammoniak in großer Menge nachweisen, dabei war die anfangs saure Reaktion in die alkalische umgeschlagen. Die Nitratreaktion war nach 3 Monaten noch sehr stark. Sporen waren nach 4-wöchentlichem Wachstum nicht gebildet.

B. simplex. Wachstum ziemlich stark, etwa wie B. lactis. Farbe der Kultur gelblich; es ist nur eine geringe Trübung vorhanden. Die Nitritaufspeicherung ist im Vergleich zum Wachstum sehr stark. Der B. ist damit mit B. asterosporus und B. subtilis zu vergleichen. Ammoniak ist nur mäßig vorhanden. Bei 3 Monate alten Kulturen ist das Verhalten genau so wie bei 14 Tage alten. Die Nitratreaktion ist noch sehr stark. Chester¹) gibt ebenfalls für Bacillus simplex starke Nitritbildung an.

B. subtilis. Der Bac. gehört zu den in VII γ am stärksten wachsenden Bakterien. Farbe der Nährlösung nach 14 Tagen braun. Die Lösung selbst sehr stark getrübt. Nitrit und Ammoniak werden in großer Menge aufgespeichert. Dabei ist aber anscheinend eine gewisse Periodizität vorhanden, so daß also einmal die Menge des Nitrits groß, dann wieder klein und schließlich wieder groß ist. In 3 Wochen alter Kultur war Nitrit nicht mehr nachweisbar, dagegen Ammoniak noch sehr stark vorhanden. Die Reaktion war dabei neutral. Nitrat war nach 14 Tagen nicht mehr vorhanden, einmal sogar bei besonders intensivem Wachstum schon nach 8 Tagen verschwunden. Dieses Zerstören des Nitrats beruht aber nicht auf Denitrifikation; ein Schäumen der Kulturen war nicht vorhanden, auch nicht in solchen, die noch einen Peptonzusatz hatten, also wie VII ε zusammengesetzt waren. Eine Erhöhung der Temperatur scheint die Schnelligkeit der Nitratzerstörung zu beschleunigen. In Kölbchen, die gleichzeitig und gleichmäßig geimpft worden waren, war in 12 Tagen bei 28° noch Nitrat vorhanden, in dem das bei 34° gestanden hatte, war es verschwunden. Wie aus später beschriebenen quantitativen Versuchen hervorgeht, wird das Nitrat in Ammoniak übergeführt. Bacillus subtilis ist von vielen Forschern auf Nitratreduktion untersucht worden, wobei die verschiedenartigsten Resultate herauskamen. Um eine Übersicht über diese Ergebnisse zu bekommen, habe ich diese in einer Tabelle (p. 392) zusammengefaßt; wo eine Rubrik offen gelassen ist, fehlen die betreffenden Angaben.

Wie aus der Zusammenstellung hervorgeht, konnten Maassen, Frankland und Gredig bei B. subtilis keine Nitratreduktion feststellen. Es hat den Anschein, als ob diese Forscher nicht B. subtilis sondern eine ihm ähnliche Bacillusspezies in Händen hatten, da nach den Feststellungen von allen anderen, sowie auch durch meine eigenen dem B. subtilis die Fähigkeit zukommt, Nitrate unter Nitrit und Ammoniakaufspeicherung zu reduzieren, und zwar sowohl in peptonhaltigen als wie auch peptonfreien Nährlösungen. Die von mir zur Untersuchung benutzte Kultur stammt von der Originalkultur her, die von Herrn Professor Meyer²) aus Heuinfus isoliert wurde und 1899 für seine Arbeit über Gei-

---

¹) Chester, 1904. p. 746.

²) Meyer, A., 1899. p. 428.

Angaben aus der Literatur über die Nitratreduktion durch **Bacillus subtilis.**

Literaturangabe	Zusammensetzung d. benutzten Nährlösung	Zeit nach der die Untersuchung stattfand	Temperatur	Intensität des Wachstums	Reaktion der Kultur	Nitritbildung	Ammoniakbildung	Bemerkungen
Maassen 1902. p. 32	5 % Peptonlösung 0,5 KNO_3	4 Wochen	ca. 30°	stark	—	keine	keine	—
Chester 1904. p. 746	—	—	—	—	—	vorhanden	—	—
Gottheil 1901. p. 69	VII u. II + 0,4 % KNO_3	—	28°	—	—	vorhanden	—	—
Fichtenholz 1888. p. 442	0,5 % KNO_3 Zucker u. mineral. Lösung	1—10 Tg.	38—39°	stark	alkalisch	vorhanden	stark vorhanden	—
Frankland 1888. p. 376	0,25 % $Ca(NO_3)_2$ Zucker, Pepton u. min. Lösg.	3—4 und 40 Tg.	30°	schwach	—	keine	keine	—
Stoklasa 1899. p. 351	—	—	—	—	—	vorhanden	nicht vorhanden	—
Warington 1888. p. 447	Rindfl.-Brühe + 0,5 % KNO_3	—	20—23° 32—37°	—	—	schwach stärker	—	Peptonzus. begünstigt die Reduktion
Gredig 1906. p. 82	Nitratbouill. + 0,3 % $Na.NO_3$ Peptonwasser + 0,5 % KNO_3	—	—	—	—	nicht vorhanden	—	Gredig gibt den untersuchten Bac. für ident. mit B. subtilis an
Beijerinck und v. Delden 1902. p. 41	Min. Lösg. Calciummalat + 0,05 % KNO_3 statt Mal. Mannit	—	—	—	—	vorhanden vorhanden	vorhanden	—

seln, Kerne und Sporenbildung der Bakterien benutzt wurde. Sie ist späterhin auch von Gottheil[1]) auf ihre Echtheit hin geprüft worden.

B. teres. Der Bacillus wächst nur schwach in der Nährlösung; nach 14 Tagen ist nur geringe Trübung festzustellen. Die Farbe ist gelbbraun.

---

[1]) Gottheil, 1901.

Nitrit wird in ziemlicher Menge aufgespeichert, ebenso Ammoniak. In 3 Monate alten Kulturen ist die Reaktion noch unverändert schwach sauer, Nitrit nur andeutungsweise, Ammoniak stark vorhanden. Die Nitratreaktion ist sehr stark.

B. tumescens. B. tumescens ist in seinem Verhalten dem B. oxalaticus und B. graveolens ganz ähnlich. Das Wachstum ist sehr stark. Die Farbe der Nährlösung nach 14-tägiger Entwicklung graugelb. Nitrit wird in keinem Entwicklungsstadium, auch nicht in Spuren, aufgespeichert. Ammoniak dagegen sehr stark. Die Reaktion der Kultur ist in den ersten 14 Tagen, auch noch bis 4 Wochen, sauer. Nach 3 Monaten ist sie aber in alkalisch umgeschlagen. Damit ist auch Nitrit in ziemlicher Menge nachzuweisen, die Ammoniakreaktion ist unverändert sehr stark. Das Nitrat wird nicht ganz aufgezehrt, auch nicht wenn die Nährlösung noch Pepton enthielt. Mit meinen Angaben stimmen die von Chester [1]), der ebenfalls für B. tumescens Nitritbildung nicht nachweisen konnte, überein.

Die in der Nährlösung VII ε untersuchten Spezies.

Die Untersuchung der hierher gehörigen Bakterien geschah genau in derselben Weise, wie dies für die in Nährlösung VII γ untersuchten beschrieben ist, nur wurde von einem Ammoniaknachweis, aus den früher schon geltend gemachten Gründen abgesehen. Auch hier sollen die Ergebnisse zunächst zur Übersicht in einer Tabelle (p. 394 u. 395) zusammengestellt werden.

Aus der Zusammenstellung ergibt sich, daß sämtliche untersuchten Bakterien in der Nährlösung wuchsen. Es war dies ja auch kaum anders zu erwarten, da Peptonlösungen fast für alle Bakterien gute Nährquellen sind. Inwieweit das Nitrat neben Pepton als Nährquelle benutzt wird, ließe sich nur an quantitativen Bestimmungen ermitteln. Bei Benutzung der Nährlösung VII ε bildeten B. robustus und B. robur kein Nitrit. Es kämen also unter den gegebenen Umständen anscheinend von den untersuchten Bakterien zwei Spezies die Fähigkeit der Nitratreduktion nicht zu; nämlich B. robur und B. robustus; alle anderen speichern mehr oder weniger stark Nitrit auf. So einwandsfrei es nun ist, aus der Nitritbildung auf stattgefundene Nitratreduktion zu schließen, so falsch ist es, anzunehmen, beim Fehlen des Nitrits werde kein Nitrat zersetzt. Das Nitrit kann sich ja auch dem Nachweis entziehen, sei es, daß es so schnell verbraucht wird, wie es entsteht, oder daß es bei saurer Reaktion wegen seiner Unbeständigkeit sich sofort zersetzt. So bildet, wie gesagt, Bacillus robur in VII ε kein Nitrit, ersetzt man aber die in dieser Nährlösung vorhandene Dextrose durch dieselbe Menge Natriumazetat, so bildet auch dieser Bacillus Nitrit, offenbar weil dieses in der nun alkalisch reagierenden Flüssigkeit beständig ist. Ich komme auf diesen Einfluß der Reaktion noch später zurück und werde dort auch auf die Angaben der Forscher, die in Peptonlösungen aus der stattgefundenen Nitritbildung auf Nitratreduktion schlossen, eingehen.

Auch in Nährlösung VII ε herrscht fast bei allen untersuchten Bakterien die sauere Reaktion vor. Ob diese sich später in die alkalische umwandelte, wurde nicht untersucht.

Das Nitrat wurde von keinem Bacillus vollständig aufgezehrt. Bei allen war nach 14 Tagen die Reaktion darauf noch sehr stark. Intensitätsunterschiede ließen sich bei den einzelnen Bakterien nicht feststellen.

---

[1]) Chester, 1904. p. 746.

Tabelle über das Verhalten der in Nährlösung

Lfd. No.	Name des Bacillus	Nähr-lösung	Intensität des Wachstums nach einer Entwicklung von 2 Wochen	Reaktion der Nährlösung nach einer Entwicklungsdauer von		
				3 Tagen	8 Tagen	14 Tagen
1	B. alvei . . .	VII ε	stark	neutral	sauer	sauer
2	B. cohaerens .	VII ε	sehr stark	schwach sauer	schwach sauer	sauer
3	B. calidus*) .	VII ε*)	ganz schwach	schwach sauer	—	schwach sauer
4	B. mycoides .	VII ε	sehr stark	schwach sauer	sauer	sauer
5	B. robustus .	VII ε	sehr stark	schwach alkal.	—	neutral
6	B. robur . .	VII ε	sehr stark	sauer	sauer	sauer
7	B. sphaericus.	VII ε	stark	neutral	neutral schwach alkal.	neutral schwach alkal.
8	B. tostus . .	VII ε*)	schwach	sauer	—	sauer
5	B. robustus .	VII ε statt Dextrose CH_3COONa	—	—	—	—
6	B. robur . .	VII ε statt Dextrose CH_3COONa	sehr stark	alkal.	nach 4 Wochen alkalisch	

Bei Bac. calidus und tostus enthält die Nährlösung 0,2 Proz. KNO_3
*) Bedeutet nicht vorhanden. Ist die Rubrik offen gelassen, so wurde nicht auf

Von den einzelnen Bakterien ist im speziellen folgendes zu bemerken:

B. alvei. Das Wachstum gestaltet sich ziemlich stark. Die Kultur stellt eine gelbliche, ziemlich stark getrübte Flüssigkeit dar. Die Nitritreaktion ist nur sehr schwach. Der Bacillus zeigt in seinem Verhalten große Ähnlichkeit mit B. sphaericus, mit dem er ja auch sehr nahe verwandt ist. Der einzige Unterschied besteht in der Reaktion, jedoch fällt dieser Umstand nicht sehr ins Gewicht.

B. cohaerens. Für B. cohaerens stellt VII ε eine sehr gute

VII ε wachsenden Bakterien gegen Nitrate.

Aussehen der Nährlösung nach einer Entwicklungsdauer von 2 Wochen		Aufspeicherung von Nitrit nach einer Entwicklungsdauer von			Nitratreaktion nach 14 Tagen resp. 4 Wochen	Bemerkungen
		3 Tagen	8 Tagen	14 Tagen		
gelb-weißliche trübe Flüssigkeit	—	sehr gering	sehr gering	—	n. 14 Tagen sehr stark	—
Farbe rotbraun, Flüssigkeit von großen Bakterienmassen trübe	—	stark	sehr stark	stark	nach 14 Tagen stark	—
rotbraun; wie B. tostus, Bodensalz aber viel geringer	—	sehr stark	sehr stark	—	nach 4 Wochen stark	—
dicke weißliche Flüssigkeit, von langen, fast fadenförmigen Bakterienmassen erfüllt; recht viel Schleim	sehr stark	sehr stark	sehr stark	stark	nach 14 Tagen stark	—
gelbgrau; von den Bakterien ganz undurchsichtig gemacht; große Bakterienmassen	—	—	—	—	nach 4 Wochen sehr stark	—
graugelb, ganz dick von Bakterienmassen	—	—	—	—	nach 14 Tagen stark	—
wie B. alvei, aber etwas weißer	—	sehr gering	sehr gering	sehr gering	nach 14 Tagen sehr stark	—
Farbe rotbraun; Bakterien in Form eines sehr festen Niederschlags am Boden; Lösung klar	—	sehr stark	sehr stark	—	nach 4 Wochen stark	—
—	—	—	—	—	—	—
gelbgraue Flüssigkeit, ganz trübe	—	ziemlich stark	nach 4 Wochen schwach		nach 14 Tagen sehr stark	—

sonst ¼ der gewöhnlichen Nährstoffkonzentration.
die betreffende Eigenschaft untersucht.

Nährquelle dar. Die Nährlösung ist nach 14-tägiger Entwicklung rotbraun und enthält große Bakterienmassen. Die Nitritreaktion ist äußerst stark. Er stimmt damit mit B. mycoides überein.

B. calidus. B. calidus zeigt in der angegebenen Nährlösung, die 0,2 Proz. Nitrat, aber nur ¼ Proz. der anderen in VII ε enthaltenen Nährstoffe enthielt, nur sehr geringes Wachstum. Die Flüssigkeit war ganz klar, rotbraun gefärbt und enthielt einen sehr festen Bodensatz, der das Bakterienwachstum darstellt. Die Nitritreaktion war aber trotzdem sehr stark, aber nur in den ersten 8 Tagen der Entwicklung, später nach 14 Tagen und auch nach 4 Wochen war Nitrit nicht mehr nachzuweisen. Die Nitratreaktion war nach dieser Zeit jedoch noch sehr stark. Da auch die Reaktion der Nährlösung sich nicht änderte, so ist ein Grund für das Fehlen des Nitrits nach 8 Tagen nicht anzugeben. Sporen bildete B. calidus nicht in der Nährlösung.

B. mycoides. B. mycoides zeigt in Nährlösung VII ε ein ganz charakteristisches Wachstum, das ihn sofort von allen übrigen Bakterien unterscheidet. Er bildet nämlich lange fadenförmige und dabei schleimige Massen, während die Lösung sonst klar erscheint. Diese Bakterienmassen hatten eine weißliche Farbe. Nitrit wird sehr stark gebildet, das Nitrat aber trotzdem nicht ganz aufgezehrt. B. mycoides ist, ähnlich wie B. sultilis, schon öfter auf Nitratreduktion untersucht worden. Die hier vorliegenden Angaben stimmen aber alle mit den oben gemachten überein. Nach Chester bildet B. mycoides stark Nitrit, ebenso nach Maassen, der ihn in 5 Proz. Peptonbouillon untersuchte. Auch Stoklasa und Vítek sprechen ihm starke Nitritbildung zu. Diese beiden haben auch B. mycoides quantitativ auf Ammoniakbildung untersucht, und fanden beispielsweise bei Gegenwart von Dextrose als Energiequelle 20,69 Proz. des zugesetzten Nitrats als Ammoniak wieder. Sie züchteten ihn dabei in einer 0,2-proz. Natriumnitratlösung, die neben dem Kohlehydrat nur mineralische Salze enthielt. Auch nach Marchal soll er in einer, bis auf die mineralischen Salze ganz ähnlich zusammengesetzten Nährlösung gut wachsen und dabei viel Nitrit und Ammoniak bilden. Diese Angaben stehen im Widerspruch mit den meinigen, da ich ihn in VII γ nicht zum Wachsen bringen konnte. Da das von Stoklasa und Vítek und von Marchal benutzte Natriumnitrat vielleicht von B. mycoides besser ausgenutzt wird als Kaliumnitrat, so untersuchte ich ihn auch mit Natriumnitrat und sonst unveränderter Lösung. Er zeigte nur ein sehr geringes Wachstum in dieser Nährlösung. Die Nitritreaktion trat nur sehr schwach ein, Ammoniak war überhaupt nicht vorhanden. Womit diese Verschiedenheiten zusammenhängen, vermag ich nicht zu sagen. Die von mir benutzte Kultur stammt von einer Originalkultur, wie sie von Gottheil für seine Untersuchungen benutzt worden war.

B. robustus. Das Wachstum von B. robustus war außerordentlich stark. Die Nährlösung zeigte nach 14-tägiger Entwicklung eine graue Farbe und enthielt einen dicken Bodensatz von Bakterienmassen. Nitrit wurde in keinem Stadium der Entwicklung aufgespeichert. Die Nitratreaktion war nach 4 Wochen noch sehr stark. Sporen wurden nicht gebildet. Ein Versuch, B. robustus in einer Nährlösung zum Wachsen zu bringen, die von derselben Zusammensetzung wie VII ε war, aber statt Dextrose 1 Proz. Natriumazetat enthielt, mißlang. Ob der Bacillus also Nitrat reduziert, muß dahingestellt bleiben.

B. robur. B. robur ähnelt in seinem Verhalten dem B. robustus, doch wächst er nicht so stark. Nitrit wird in keinem Entwicklungsstadium aufgespeichert. Die Reaktion ist stets sauer. B. robur wurde ebenfalls in der bei B. robustus beschriebenen Nährlösung untersucht. Er wuchs ebenso stark darin wie in VII ε. Es ließ sich auch 3 Tage nach dem Impfen Nitrit in ziemlicher Menge nachweisen, wobei die Reaktion alkalisch war. Nach vierwöchentlichem Wachstum ist die Reaktion noch unverändert, auch Nitrit noch vorhanden. B. robur reduziert also wahrscheinlich auch in VII ε das Nitrat, nur läßt sich das Nitrit nicht nachweisen.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

B. sphaericus. Der Bacillus verhält sich genau wie B. alvei, siehe diesen.

B. tostus. Das Verhalten dieses Bacillus entspricht vollkommen dem von B. calidus.

Welche Bedeutung kommt dem Verhalten der einzelnen Bakterien bei der Nitratreduktion in speziesdiagnostischer Hinsicht zu?

Nach den Angaben von Maassen[1]) zeigten verschiedene Stämme von Diphtheriebazillen und von B. aërogenes, also nahe verwandte Bakterien, ein verschiedenes Verhalten bei der Nitratreduktion. Ich konnte dies bei den von mir untersuchten Bakterien nicht feststellen. Nahe verwandte Spezies, wie B. tumescens und B. graveoleus, sowie B. alvei

Namen der Bakterien, die gegenseitige Ähnlichkeit miteinander haben	Literatur-angabe	Unterscheidungsmerkmale hinsichtlich der Nitrat-Reduktion
B. robur und B. Ellenbachensis	Neide 1904 p. 24	B. robur wächst nur in VII ε, nicht in VII γ und bildet kein Nitrit. B. Ellenbachensis wächst in VII γ und bildet stark Nitrit.
B. robur und B. mycoides	Neide 1904 p. 24	B. robur bildet in VII ε kein Nitrit, B. mycoides dagegen sehr stark.
B. silvaticus und B. Petasites	Neide 1904 p. 30	B. silvaticus bildet in VII γ kein Ammoniak, sondern gibt nur mit Nesslers Reagens einen gelben Niederschlag. B. Petasites bildet nach 14-tägiger Entwicklung viel Ammoniak.
B. lacticola und B. Petasites	Neide 1904 p. 174	B. lacticola wächst nur schwach in VII γ und bildet Nitrit. B. Petasites wächst stark darin und bildet kein Nitrit.
B. lacticola und B. lactis	Neide 1904 p. 174	B. lacticola wächst schwach in VII γ und bildet kein Ammoniak. B. lactis wächst stark darin und bildet Ammoniak.
B. teres und B. cohaerens	Neide 1904 p. 167	B. teres wächst in VII γ; B. cohaerens nicht.
B. lactis und B. Petasites	Neide 1904 p. 343	B. lactis bildet in VII γ Nitrit. B. Petasites bildet keins.
B. parvus und B. pumilus	Neide 1904 p. 348	B. parvus wächst sehr gut in VII γ und bildet viel Nitrit und Ammoniak. B. pumilus wächst nur schwach darin und bildet nur sehr wenig Nitrit und Ammoniak.
B. sphaericus und B. fusiformis	Neide 1904 p. 542	B. sphaericus wächst nur in VII ε. B. fusiformis wächst schon in VII γ.
B. oxalaticus und B. ruminatus	Vahle 1910 p. 234	B. oxalaticus wächst stark in Nährlösung VII γ und bildet viel Ammoniak. B. ruminatus wächst ziemlich stark darin und bildet kein Ammoniak.

---

[1]) Maassen, 1902. p. 35.

und B. sphaericus, verhielten sich bei der Nitratreduktion fast vollkommen gleich, wie das ja auch aus den Tabellen näher hervorgeht. Trotzdem ist die Art, wie das Nitrat von den Bakterien zersetzt wird, sehr gut als speziesdiagnostisches Merkmal zu gebrauchen, da viele Bakterien hier ganz charakteristische Eigenheiten zeigen. Die einen speichern Nitrit, die anderen Ammoniak und ein dritter Teil beide zugleich auf. Manche Bakterien wachsen schwach, andere stark in der Nährlösung usw. Es lassen sich auf diese Weise Spezies, die sonst nur schwer voneinander zu unterscheiden sind, leicht und sicher auseinander halten, wie das aus vorstehender Zusammenstellung hervorgeht.

Zusammenfassung.

Von den 28 untersuchten Bakterienspezies ließ sich also nur für B. robustus der Nachweis der Nitratreduktion nicht erbringen. Es ist damit aber nicht gesagt, daß diesem die Fähigkeit, Nitrat zu zerstören, nicht zukommt. Ein Urteil hierüber läßt sich nur durch quantitative Versuche gewinnen. Die Nitratreduktion scheint also eine sehr weit verbreitete Eigenschaft der Bakterien zu sein, wie ja auch die große Zahl Nitrat reduzierender Bakterien, die von Maassen (1902. p. 28), Gredig (1906), Frankland (1889. p. 373), Heraeus (1888. p. 192), Dieudonné (1895. p. 508) und anderen Forschern beschrieben wurden, beweist.

Ein Vergleich der vorliegenden Angaben mit den Ergebnissen der anderen Autoren läßt sich nicht ohne weiteres durchführen, da diese alle annehmen, daß die Nitratreduktion mit einer Aufspeicherung von Nitrit oder Ammoniak in den Nährsubstraten verbunden sein muß und demgemäß bei ihren Untersuchungen verfuhren. Nach den vorliegenden Untersuchungen muß diese Annahme aber fallen gelassen werden. Die Nitrit- und Ammoniakaufspeicherung ist lediglich von den jeweiligen Bedingungen abhängig, wie auch noch später gezeigt wird. Beim Fehlen von Nitrit und Ammoniak kann man also nicht ohne weiteres sagen, daß kein Nitrat zerstört wird, wie es alle früheren Autoren annahmen.

b) Verhalten der Bakterien gegen Nitrite, mit Einschluß der hemmenden Wirkungen, die Nitrite auf das Wachstum der Bakterien ausüben.

α) Vermögen unsere Bakterien das Nitrit zu reduzieren, wenn es ihnen als alleinige Stickstoffquelle geboten wird?

Über die Fähigkeit unserer Bakterien, Nitrit zu reduzieren, ist schon in dem Kapitel über Nitratreduktion gesprochen worden. Da nämlich das Nitrat immer erst zu Nitrit reduziert wird, ehe es in Ammoniak übergeht, so kann man ja auch sagen, das Nitrit werde in Ammoniak übergeführt. In diesem Kapitel soll die Nitritreduktion behandelt werden, wenn es den Bakterien als solches, bei Abwesenheit von Nitrat, geboten ist. Es ist ja möglich, daß die Bakterien sich dem freien Nitrit gegenüber anders verhalten, als wenn sie sich es nach Bedarf selbst bilden können.

Über die so definierte Nitritreduktion sind, soweit aus der Literatur ersichtlich ist, nur wenige Untersuchungen gemacht worden, und auch hier, wie bei der Nitratreduktion, teilweise an nicht wiederzuerkennenden Spezies. Gredig hat 1906. (p. 28) aus Neckarwasser isolierte Bakterien auf Nitritzersetzung geprüft. Er fand dabei, daß sechs davon das Nitrit reduzieren. Ob sie dabei Ammoniak bilden, vermochte er nicht anzugeben, da er als Nährlösung Pepton mit Nitritzusatz benutzte. Zwei von den Spezies sollen Nitrat nicht reduzieren. Den Angaben von Gredig[1]) kommt kein großer Wert zu, da er mit Bakterien gearbeitet hat, die infolge der mangelhaften Beschreibung nicht wiederzuerkennen sind. Beijerinck und v. Delden[2]) untersuchten 1902 B. subtilis, B. mesentericus vulgatus und Chroococcum, und zwar in einer Nährlösung, die nur Nitrit als Stickstoffquelle enthielt. Bei Calciummalat als Kohlenstoffquelle bildete nur Chroococcum Ammoniak, bei Gegenwart von Mannit auch noch B. mesentericus vulgatus, B. subtilis bildeten in keinem Falle Ammoniak. Die umfangreichsten Untersuchungen über Nitritzersetzung hat Maassen gemacht. Er benutzt dazu eine 5-proz. Peptonlösung mit 0,01 und 0,005 Proz. Natriumnitrit. Von 109 untersuchten Bakterien zeigten 50 nitritzerstörende Eigenschaften, während 59 Arten solche nicht erkennen ließen. Da ein Ammoniaknachweis in dieser Nährlösung nicht einwandfrei war, so wurde eine Nitritzersetzung angenommen, wenn letzteres sich nicht mehr oder doch nur in geringen Mengen nachweisen ließ. Es ist also möglich, daß auch von den Bakterien, welchen keine nitritzerstörenden Eigenschaften zukommen sollen, einige das Nitrit angreifen, da es sehr schwierig ist, aus der Intensität der Nitritreaktion auf ein Verschwinden des Nitrits zu schließen. Zusatz von Glyzerin und Traubenzucker zu der Nährlösung begünstigte die Nitritzersetzung, so daß dann auch Bakterien, welche in den Peptonlösungen das Nitrit anscheinend nicht angriffen, dieses zum Verschwinden brachten. Beispielsweise B. megathaerium, B. mesentericus vulgatus, B. pestis astaci, B. typhi abdominalis.

Für unsere Versuche wurde von einer Benutzung einer peptonhaltigen Lösung abgesehen, einmal wegen der Unsicherheit, welche dem Nachweis entgegensteht, ob Nitrit verbraucht ist oder nicht, und dann auch, weil es in derartigen Lösungen nicht möglich war, Ammoniak zu erkennen. Als Nährlösung diente ausschließlich eine solche, die 0,01 Kaliumnitrit, 1,0 Dextrose und 100 M-Nährlösung enthielt. Sie ist in folgendem mit VIII β bezeichnet. Die Konzentration von 0,01 Proz. Nitrit wurde gewählt, weil die große Mehrzahl der Bakterien bei 0,1 Proz. nicht mehr zum Wachsen kam. Ob Nitrit verbraucht wurde, war hier neben der Ammoniakbildung schon am Wachstum zu erkennen. Trat keine Entwicklung ein, so wurden die betreffenden Bakterien nicht weiter untersucht. Die Bereitung der Nährlösung geschah genau so, wie es bei VII γ für diese angegeben ist. Sie hatte eine gelbliche Farbe und reagierte für Lackmuspapier schwach sauer. Untersucht wurde in der Regel 8 und 14 Tage nach dem Impfen auf Ammoniakbildung, Nitritzersetzung, Wachstum und Reaktion. Bei einzelnen Bakterien, welche das Nitrit schnell zerstörten, wurde zu anderen Zeiten, wie dies in der Tabelle angegeben ist, die Untersuchung vorgenommen. Geimpft wurde hier ausschließlich mit entwicklungskräftigem Stäbchenmaterial, da nur bei wenigen Spezies die Sporen in der Nährlösung keimten. Im übrigen gelten die bei Nährlösung VII γ gemachten Angaben.

Die Versuchsergebnisse sind zunächst in einer Tabelle (p. 400) zusammengestellt. — bedeutet keine Entwicklung. Ist eine Rubrik freigelassen, so wurde nicht auf die betreffende Eigenschaft untersucht.

Es kamen also von den untersuchten 28 Bakterien 12 in der Nährlösung nicht zur Entwicklung. Die übrigen wuchsen mehr oder weniger stark, be-

---

[1]) Gredig. 1906. p. 43 ff.

[2]) Beijerinck u. v. Delden. 1902. p. 41.

Tabelle über das Verhalten der Bakterien gegen Nitrit.

Lfd. No.	Name des Bacillus	Nähr-lösung	Wachs-tums-inten-sität	Ammoniak-aufspeicherung nach		Reaktion der Nähr-lösung	Ist am Ende der Entwicklung noch Nitrit vorhanden	Bemer-kungen
				3—8 Tagen	14 Tagen			
1	B. alvei	VIII β	—	—	—	—	—	Alle anderen Bakterien zeigen keinerlei Entwicklung in der Nährlösung.
2	B. asterospor.	VIII β	schwach	ganz gering	—	schwach sauer	nach 14 Tg. noch stark vorhanden	
3	B. carotarum	VIII β	schwach	ziemlich stark	—	neutral	nach 14 Tg. Nitr. s. schw.	
4	B. cohaerens	VIII β	schwach	do.	schwach	schwach sauer	nach 14 Tg. Nitr. stark	
5	B. cylindricus	VIII β	ziemlich stark	stark	—	sauer	nach 5 Tg. Nitrit —	
6	B. Ellenbach.	VIII β	—	—	—	—	—	
7	B. fusiformis	VIII β	—	—	—	—	—	
8	B. graveolens	VIII β	stark	—	—	sauer	nach 8 Tg. Nitrit — —	
9	B. lactis	VIII β	—	—	—	—	—	
10	B. lacticola	VIII β	—	—	—	—	—	
11	B. luteus	VIII β	stark	ziemlich stark	—	sauer	nach 8 Tg. Nitrit — —	
12	B. megathaer.	VIII β	schwach	—	—	schwach sauer	nach 14 Tg. Nitr. zieml. stark	
13	B. mycoides	VIII β	—	—	—	—	—	
14	B. oxalaticus	VIII β	schwach	ziemlich stark	n. 3 Wch. s. stark	schwach sauer	nach 3 Wch. Nitr. vorhd.	
15	B. parvus	VIII β	stark	—	—	schwach sauer	nach 3 Tg. Nitrit — —	
16	B. Petasites	VIII β	stark	—	—	sauer	nach 8 Tg. Nitrit — —	
17	B. pumilus	VIII β	—	—	—	—	—	
18	B. ruminatus	VIII β	schwach	ziemlich stark	schwach	schwach sauer	nach 14 Tg. Nitr. stark	
19	B. silvaticus	VIII β	stark	stark	—	schwach sauer	nach 3 Tg. Nitrit — —	
20	B. simplex	VIII β	ziemlich stark	—	ganz gering	schwach sauer	nach 14 Tg. Nitrit noch vorhanden	
21	B. subtilis	VIII β	stark	—	—	schwach sauer	nach 8 Tg. Nitrit — —	
22	B. sphaericus	VIII β	—	—	—	—	—	
23	B. teres	VIII β	schwach	schwach	—	schwach sauer	nach 14 Tg. Nitr. vorh.	
24	B. tumescens	VIII β	stark	stark	—	sauer	nach 8 Tg. Nitrit — —	

sonders kräftig: B. graveolens, B. luteus, B. Petasites, B. parvus, B. silvaticus, B. subtilis und B. tumescens. Die Nährlösung war bei diesen immer sehr stark getrübt. Diese Bakterien waren auch imstande alles Nitrit aufzuzehren, was ja auch bei der geringen Menge nicht weiter auffallend ist.

B. parvus und B. silvaticus hatten es beispielsweise schon nach 3 Tagen aufgezehrt, bei den übrigen dauerte es länger, etwa 8 Tage. Bei den Bakterien, die schwache oder mittelmäßige Entwicklung in der Nährlösung zeigten, wurde das Nitrit, soweit die Untersuchung reichte, nicht völlig zum Verschwinden gebracht. Eine Ausnahme macht auch hier B. cylindricus. Da auch bei diesen Bakterien nach 8 Tagen etwa der Höhepunkt der Entwicklung erreicht war, so können sie anscheinend nicht den gesamten, in dem Nitrit enthaltenen Stickstoff zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwerten.

Ammoniak wurde von verschiedenen Bakterien gebildet, aber meist in viel geringeren Mengen als in VII γ. Relativ am stärksten war die Ammoniakreaktion bei B. tumescens. Bei B. subtilis, B. parvus und B. graveolens läßt sich überhaupt keines nachweisen, wohl deshalb, weil diese dasselbe auch gleich zum Aufbau mitverwandten.

Die Reaktion der Nährlösung war ausnahmslos schwach sauer. Die gebildete Säure konnte also in keinem Falle vollkommen neutralisiert werden.

Bei einem Vergleich der mit VIII β erzielten Ergebnisse mit denen von VII γ und VII ε, fällt vor allem auf, daß das Nitrit anscheinend eine viel schlechtere Nährquelle darstellt, als Nitrat, selbst bei dieser sehr geringen Konzentration. Womit dies zusammenhängt, ist schwer zu sagen, es ist möglich, daß das Nitrit nur unter diesen Umständen dem Nitrat an Nährkraft nachsteht, es ist aber auch nicht ausgeschlossen, daß es für manche Bakterien schon in dieser Konzentration hemmend wirkt. Von manchen Forschern wurde behauptet, daß Nitrite eine bessere Nährquelle darstellten als Nitrate. Derartige Angaben sind aber mit großer Vorsicht aufzunehmen. Denn alle diese Resultate sind in Peptonlösungen gewonnen worden. Wächst eine Spezies in einer solchen Lösung bei Gegenwart von Nitrat, ohne Nitrit zu bilden, und reduziert sie andererseits Nitrit in derselben Lösung, so ist noch lange nicht gesagt, daß sie das Nitrat nicht angreift. Sie kann dies ja auch reduzieren, ohne Nitrit dabei aufzuspeichern. Die Angaben von Gredig[1]), daß zwei von seinen Bakterien Nitrit verbrauchten, ohne Nitrat zu reduzieren, und die von Maassen[2]), daß einzelne Bakterien die Fähigkeit hatten, Nitrite zu reduzieren, ohne Nitrat anzugreifen, sind also dementsprechend zu bewerten, da beide Autoren bei Gegenwart von Pepton gearbeitet haben. Im allgemeinen zeigte sich bei unseren Bakterien, daß die, welche in VII γ schlecht oder gar nicht wuchsen, auch in VIII β nicht zur Entwicklung kamen, während andererseits für die in VII γ gut wachsenden auch Nitrit eine gute Nährquelle abgab. Eine Ausnahme macht B. cohaerens, der in VII γ überhaupt kein Wachstum, in VIII β aber eine geringe, doch deutliche Entwicklung zeigte. Für diese Spezies scheint also unter den gegebenen Bedingungen VIII β eine bessere Nährquelle zu sein. Von den in VII γ gut wachsenden Bakterien kamen auch alle in VIII β gut fort, mit Ausnahme von B. oxalaticus, der hier nur geringe Entwick-

---

[1]) Gredig. 1906. p. 41 ff.

[2]) Maassen. 1902. p. 49.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

lung zeigt, so daß nach 14 Tagen und auch nach 3 Wochen noch Nitrit in beträchtlicher Menge vorhanden ist.

Überhaupt ist es nicht nötig, anzunehmen, daß für die in VIII β schlecht oder gar nicht wachsenden Bakterien das Nitrit eine schlechte Nährquelle sei. Es ist leicht möglich, daß unter anderen Bedingungen, beispielsweise bei Gegenwart von Glyzerin oder Salzen organischer Säuren, ein besseres Wachstum erfolgt, wie dies ja Maassen[1]) beobachtet hat.

. Das Verhalten der einzelnen Bakterien in VIII β hat als speziesdiagnostisches Merkmal wenig Wert. Einzelne Bakterien, z. B. B. lactis und B. Petasites, B. parvus und B. pumilus und auch B. lacticola lassen sich auf diese Weise sicher auseinanderhalten. Es soll aber nicht weiter darauf eingegangen werden.

β) Untersuchungen über den hemmenden Einfluß den Nitrite auf das Wachstum einzelner Bakterien ausüben:

Vergleicht man die einzelnen Bakterien, vor allem die in Nährlösung VII γ untersuchten, hinsichtlich ihrer Fähigkeit, während der Nitratreduktion Nitrite aufzuspeichern, so sieht man, daß diese Eigenschaft sehr variiert. Während einzelne, wie B. subtilis und B. asterosporus, in allen Fällen Nitrit in ziemlicher Menge aufzuspeichern vermögen, läßt es sich bei anderen, wie B. lactis und B. carotarum, nur in geringer und bei einer Anzahl von Bakterien, wie B. tumescens, B. oxalaticus und B. Petasites, auch nicht in Spuren nachweisen. Bei der Frage nach der Ursache dieser Erscheinung lag es nahe, an eine besondere Empfindlichkeit dieser Spezies Nitriten oder richtiger der salpetrigen Säure gegenüber zu denken und darauf das verschiedene Verhalten zurückzuführen. Nach den allgemeinen, auch durch Versuche gestützten Annahmen sind die Nitrite resp. die salpetrige Säure starke Gifte für den lebenden Organismus. Über die hemmenden Wirkungen, die Nitrite auf das Wachstum der Bakterien ausüben, liegen allerdings nur wenige Mitteilungen vor. Nach Laurent (1890. p. 722) wirken salpetrigsaure Salze schon in geringer Konzentration entwicklungshemmend. Loew (1893. p. 119) gibt dasselbe an. Beide hatten es aber bei ihren Versuchen mit Mischkulturen zu tun. Nach Maassen (1902. p. 40) wurden die von ihm untersuchten Mikroorganismen auf schwachsauren Nährböden durch die Gegenwart salpetrigsaurer Salze ganz auffallend in ihrem Wachstum geschädigt, ja für die Mehrzahl dieser Bakterien erwiesen sich die Nitrite unter diesen Umständen geradezu giftig. Auch in alkalisch reagierendem Nährböden trat schon bei geringem Nitritgehalt eine entwicklungshemmende Wirkung der Nitrite deutlich hervor. Meist vertrugen die Bakterien noch bis 0,1 Proz. salpetrigsaures Salz (Natriumnitrit). Die Angaben von Maassen gelten anscheinend für Peptonlösungen; ein besonderer Hinweis über die Art des Nährbodens ist nicht gemacht. Auch Weißenberg (1897. p. 274) gibt an, daß in saueren Nährlösungen Nitrite schon in den geringsten Mengen giftig wirken, und darum besonders auf alkalische Reaktion zu achten sei.

Alle Autoren betonen also, daß in sauerer Lösung die Giftwirkung der Nitrite für Bakterien besonders groß sei. Sie ist also wohl hauptsächlich der salpetrigen Säure zuzuschreiben, die sich bei Gegenwart von Säuren aus den Salzen bildet. Viel weniger giftig scheinen die salpetrigsauren Salze zu sein.

---

[1]) Maassen. 1902. p. 50.

Die vorliegenden Versuche sollten sich ursprünglich nur darauf beziehen festzustellen, bis zu welcher Konzentration einzelne Bakterien Nitrit in Nährlösung VII γ vertragen könnten, um hieraus eine Erklärung für das verschiedene Verhalten bei der Nitratreduktion zu gewinnen. Im Verlaufe der Untersuchung trat aber auch die Frage, welchen Einfluß die Zusammensetzung der benutzten Nährlösung auf die Giftwirkung der Nitrite ausübt, in den Vordergrund.

Um die Feststellung, ob Wachstum eingetreten sei oder nicht, zu erleichtern, wurde bei allen Versuchen, wo es nicht anders bemerkt ist, von Sporen ausgegangen, die eine halbe Minute im siedenden Wasserbad abgekocht waren. Alle Angaben beziehen sich auf eine Entwicklungsdauer von 3 Tagen, von welchem Zeitpunkt an eine Änderung in dem Verhalten der Kulturen nicht mehr zu beobachten war. Bei den Untersuchungen wurden Reagenzröhrchen von 12 cm Länge und 1 cm Weite benutzt, die mit 3 ccm Nährlösung beschickt waren. Nach dem Zusatz des Nitrits wurden die Röhrchen in der üblichen Weise im Dampftopf sterilisiert, geimpft und in den Brutschrank bei 28° C gestellt. Als Nitrit wurde immer Kaliumnitrit verwandt.

γ) Versuche über den Einfluß, den die Reaktion und die Zusammensetzung der benutzten Nährlösung auf die Giftwirkung der Nitrite ausübt.

a) Mit neutralem D-Agar.

Zur Orientierung über das Verhalten der Bakterien wurden die Versuche mit neutralem D-Agar begonnen, dem eine bestimmte Menge Nitrit zugesetzt wurde. Der Agar wurde nach der im Praktikum (p. 17) gegebenen Vorschrift angefertigt, nur wurden statt des dort angegebenen 1,6 Proz. Agars 2 Proz. benutzt. Zur Untersuchung kamen folgende acht Spezies:

B. asterosporus, B. subtilis, B. tumescens, B. oxalaticus, B. luteus, B. silvaticus, B. simplex und B. mycoides.

Als Nitritkonzentration wurde 1 Proz., 2 Proz., 3 Proz. und 4 Proz. gewählt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (p. 404) zusammengestellt.

Die Bakterien können also auf neutralem D-Agar ganz erstaunlich hohe Nitritkonzentrationen ertragen. Meist hört das Wachstum erst bei 3—4 Proz. auf, und zwar zuerst auf der Fläche des Agars, dann erst im Kondenswasser. In allen Fällen ist das Wachstum aber sehr schwach, das Kondenswasser kaum getrübt und der Belag kaum vom Agar zu unterscheiden. Normales Wachstum wie auf gewöhnlichem D-Agar trat bei B. tumescens und B. subtilis erst ein, wenn die Nitritkonzentration weniger als 0,1 Proz. betrug. Die Bakterien werden also schon bei Gegenwart von relativ wenig Nitrit in ihrer Entwicklung gehemmt, während die Konzentration, in der es tödlich wirkt, sehr hoch liegt.

b) Versuche mit Peptonlösungen.

Hierzu wurde Nährlösung I (1,0 Pepton, 1,0 Rohrzucker, 1,0 Fleischextrakt, 100,0 Wasser) benutzt, die also, vom Agar abgesehen, ganz ähnlich wie D-Agar zusammengesetzt ist. Die Nitritkonzentrationen waren dieselben wie vorher, also 1, 2, 3 und 4 Proz. Die Nährlösung reagierte nach dem Zusatz des Nitrits in allen Fällen ganz schwach alkalisch. Als Versuchsspezies dienten

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle über die Giftwirkung des Nitrites bei Anwendung von D-Agar.

Name des Bacillus	Menge des zugesetzten Nitrits							
	1,0 %		2 %		3 %		4 %	
	Kondenswasser	Agar	Kondenswasser	Agar	Kondenswasser	Agar	Kondenswasser	Agar
B. asterosporus	schwach getrübt, Schwärmer und ganz lange Fäden	geringer Belag	geringe Trübung, viele Schw.	kein sichtb. Wachstum	nicht getrübt, aber vereinz. Schw.	—	—	—
B. subtilis	schwach getrübt, sehr viele Schw. vorh.	geringer Belag	schwach getrübt, viele Schw. vorh.	kein sichtb. Wachstum	wie 2 %	sehr geringer Belag	—	—
B. tumescens	Schwach getrübt, s. viele Schw. vorhand.	geringer Belag	wie 1 %	Viele Einzelkolonien	Nicht getrübt, aber vereinzelt Schw.	—	—	—
B. silvaticus	Geringe Trübung, viele Schwärmer	geringer Belag	wie 1%	Viele kleine Einzelkolonien	Schwach getrübt, meist Fäden vorhand.	—	kein sichtbares Wachstum, aber Fäden vorhanden	—
B. mycoides	Ziemlich stark getrübt, sehr viele Schw.	geringer Belag	wie 1 %	wie 1 %	Nicht getrübt, aber Schw. vorhand.	wie 1 %	Keine Trübung, aber vereinzelt Schwärmer	—
B. simplex	Schwach getrübt, viele Schw.	geringer Belag	wie 1 %	ganz geringer Belag	Keine Trübung, vereinzelt Stäbchen	—	—	—
B. oxalaticus	Schwache Trübung, viele Schw.	Kräftig entwickelte Einzelkolonien	etwas geringer wie 1 %	geringer Belag	Keine Trübung, aber Schw. in ziemlichen Mengen	ganz geringer Belag	Keine Trübung, aber vereinzelt Schwärmer	—
B. luteus	Schwach getrübt, sehr viele Schw. vorhanden	do.	wie 1 %	ganz geringer Belag	ganz geringe Trübung, vereinzelte Stäbchen	Vereinzelte Kolonien	—	—

hier nur B. tumescens, B. subtilis und B. asterosporus. Die Bakterien entwickelten sich bei allen Nitritkonzentrationen, nur B. asterosporus zeigte bei 4 Proz. kein Wachstum. Bei 1 Proz. wuchsen

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

die Bakterien am stärksten. Die Lösungen waren hier ziemlich stark getrübt, bei den höheren Konzentrationen wurde das Wachstum stufenweise schwächer. Bei den Röhren mit 4 Proz. Nitrit war es nur durch mikroskopische Untersuchung zu erkennen. In allen Fällen reagierten die Kulturen alkalisch, Ammoniak war in außerordentlich großer Menge vorhanden.

c) Versuche mit Asparaginlösung.

Zu diesen Versuchen wurde Nährlösung V (Prakt. p. 27) (1,0 Asparagin, 1,0 Dextrose, 0,5 Glyzerin, 100,0 M-Nährlösung) verwendet. Die Menge des zugesetzten Nitrits betrug hier 0,01 Proz., 0,025 Proz., 0,05 und 0,1 Proz., nachdem durch frühere Untersuchung festgestellt war, daß bei Gegenwart von 0,2 Proz. Nitrit in keinem Falle mehr Wachstum eintrat. Als Versuchsspezies dienten B. subtilis und B. tumescens. Bei allen Konzentrationen trat ziemlich starkes Wachstum ein, ohne daß ein sonderlicher Unterschied in der Intensität zu bemerken gewesen wäre. Bei 0,01 Proz. reagierten die Kulturen neutral, die Reaktion schlug allmählich nach sauer hin um, so daß bei 0,1 Proz. schwachsaure Reaktion herrschte.

d) Versuche mit einer Nährlösung, die nur Nitrit als Stickstoffquelle enthielt.

Die Nährlösung hatte die Zusammensetzung 1,0 Dextrose, 100,0 M-Nährlösung, und dazu noch die gewählte Nitritmenge. Diese betrug hier 0,05, 0,1, 0,2 und 0,4 Proz. Die Nährlösung reagierte in allen Fällen ganz schwach sauer. Als Versuchsspezies dienten B. tumescens, B. subtilis, B. asterosporus. Geimpft wurde mit gut schwärmendem Stäbchenmaterial, da Sporen nur schlecht in einer derartig zusammengesetzten Nährlösung keimten. Alle Bakterien wuchsen noch bis zu einer Konzentration von 0,1 Proz. B. subtilis zeigte auch noch bei 0,2 Proz. ganz geringes Wachstum. Darüber hinaus war aber keinerlei Entwicklung zu bemerken. In allen Kulturen war die Reaktion ganz schwach sauer. Dies Ergebnis stimmt überein mit den Resultaten, die bei Untersuchung der einzelnen Bakterien hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Nitrit zu reduzieren, erzielt wurden (s. p. 400). Nur wenige Bakterien vermochten, sich in einer Lösung mit 0,1 Proz. Nitrit zu entwickeln; außer den vorgenannten nur noch B. teres, B. lactis und B. silvaticus.

Zusammenfassung.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht also hervor, daß die Bakterien in saurer Lösung nur in wenigen Fällen mehr als 1,0 Proz. Nitrit (Kaliumnitrit) vertragen können; in alkalischer Lösung muß, um Wachstum zu verhindern, die Nitritkonzentration zwar viel größer sein, aber auch hier ist schon bei Gegenwart von 0,1 Proz. eine deutliche Entwicklungshemmung zu bemerken. Diese Tatsachen waren bisher schon bekannt; es lagen aber keine genaueren Mitteilungen vor, für welche Bakterien und für welche Nährlösung sie zu gelten hatten.

Worin der Einfluß der benutzten Nährlösung auf die Giftwirkung der Nitrite besteht, läßt sich nicht mit absoluter Sicherheit sagen. Es ist möglich, daß die Bakterien bei Gegenwart von gut nährenden Stoffen, beispielsweise Pepton, das Nitrit besser vertragen können. Wahrscheinlicher ist aber, daß der Einfluß von Pepton darin besteht, daß die Bakterien mit dem hieraus gebildeten Ammoniak die aus Dextrose erzeugte Säure neutralisieren können und so unter besseren Lebensbedingungen zu wachsen vermögen. In Nährlösung Vα und VIIIβ, wo die Bakterien die Säure nicht neutralisieren können, unterbleibt deshalb schon bei 0,1 Proz. Nitrit das Wachstum.

Jedenfalls ist es bemerkenswert, daß Pepton eine Ausnahmestelle einnimmt unter den benutzten Nährstoffen. Es hat sich dies auch bei anderen Versuchen (s. Kap. über Gasbildung von B. asterosporus) ergeben.

Ist das verschiedene Verhalten der Bakterien in Nährlösung VIIγ hinsichtlich der Nitritaufspeicherung auf die Giftwirkung der Nitrite zurückzuführen? Zur Prüfung dieser Frage wurden die gewählten Bakterien in Nährlösung VIIγ, der 0,001 und 0,005 Proz. Kaliumnitrit zugesetzt war, geimpft. Als Versuchs, spezies dienten B. subtilis, B. tumescens und B. Petasites-die, mit Ausnahme von B. subtilis, Nitrit unter diesen Bedingungen nicht aufspeicherten. Geimpft wurde mit einem Gemisch von Stäbchen und Sporenmaterial. Bei 0,001 Proz. Nitrit kamen alle Bakterien zum Wachstum, aber nur bei B. subtilis war eine nennenswerte Entwicklung eingetreten, bei den übrigen war sie stark gehemmt. Bei 0,005 Proz. war B. subtilis und auch noch B. Petasites, dieser aber nur in geringem Maße, gewachsen. Aus der Tatsache, daß schon bei Gegenwart von 0,001 Proz. Nitrit das Wachstum bei den nicht nitritaufspeichernden Spezies stark geschwächt war, kann man schließen, daß bei diesen Formen in N. L. VIIγ eine Anhäufung von Nitrit wegen dessen Giftigkeit unterbleibt, die hier besonders groß ist, weil bei diesen Formen die Kultur saure Reaktion zeigt. Bei B. subtilis, wo die Nährlösung während des Wachstums neutral reagiert, ist die Giftwirkung der Nitrite nicht so groß, weshalb diese in ziemlichem Maße aufgespeichert werden können.

2. Kapitel.

Untersuchungen über den Einfluß, den verschiedene Faktoren auf die Reduktion von Nitraten und auf die Bildung von Nitrit und Ammoniak ausüben.

a) Reaktion der Nährlösung.

Laurent[1]) hatte 1891 bei der Untersuchung von Pilzen auf Nitratreduktion gefunden, daß einige, z. B. Penicillium glaucum, Mucor racemosus, Aspergillus niger, das gebotene Nitrat direkt zu Ammoniak reduzierten, ohne Nitrit als Zwischenprodukt zu bilden. Er hatte dieser Tatsache keine Beachtung geschenkt. Im Jahre 1911 kam nun Ritter[2]) auf diese Untersuchungen von Laurent zurück, und stellte dabei fest, daß diese scheinbar direkte Reduktion der Nitrate zu Ammoniak durch die saure Reaktion der Nährlösung hervorgerufen werde, weil sich das eventuell gebildete Nitrit wegen seiner großen Unbeständigkeit in sauren Lösungen sofort zersetzte und sich darum nicht nachweisen ließe. Sorgte er dafür, daß die Kulturen alkalisch reagierten, so ließ sich auch Nitrit nachweisen, wenn auch lange nicht in der Menge, wie bei den typischen Nitritbildnern. Um diese alkalische Reaktion herbeizuführen, verwandte er verschiedene Methoden, einmal einen Zusatz von Calciumkarbonat, das die entstehende Säure sofort bindet, dann geeignete Auswahl der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle und schließlich auch noch das Übertragen des Pilzes aus einer sauren Nährlösung, in der er sich gut entwickelt hatte, in eine alkalische. Je nach der Art des Pilzes bewährte sich die eine oder andere Methode am besten. Für Bakterien war bis jetzt eine derartige direkte Nitratreduktion nicht beobachtet worden. Bei der Untersuchung unserer Bakterien in Nährlösung VII γ fanden sich aber drei Spezies, denen diese Eigenschaft zukam, nämlich B. tumescens, B. oxalaticus und B. graveolens. Auch hier war die Reaktion der Nährlösung sauer. Es lag deshalb nahe, dies Verhalten auf die Weise von Ritter zu deuten. Neben diesen fanden sich aber auch zwei Spezies, B. fusiformis und B. lacticola, die Nitrat nur zu Nitrit reduzierten, trotzdem aber gut in der Nährlösung wuchsen, und schließlich noch 3, nämlich B. silvaticus, B. megathaerium und B. ruminatus, die unter den gegebenen Bedingungen weder Nitrit noch Ammoniak bildeten. Da auch alle diese Erscheinungen möglicherweise auf der Reaktion der Nährlösungen beruhen konnten, so wurden mit sämtlichen genannten Bakterien Untersuchungen in dieser Richtung angestellt, und, um ein klares Bild über den Einfluß der Reaktion zu erhalten, auch noch andere geeignet erscheinende Bakterien in den Kreis der Versuche einbezogen. Zunächst wurden Versuche mit Zusatz von Calciumkarbonat gemacht. Zu der Nährlösung VII γ wurde etwa ½ g Schlemmkreide gefügt und dann die Lösung mit gut schwärmendem Material der Versuchsspezies, es waren hier B. tumescens und B. oxalaticus, versetzt. Sporen keimten nicht in der Nährlösung bei dem Karbonatzusatz, überhaupt war das Wachstum gegen sonst stark geschwächt. Positive Resultate ließen sich auf diese Weise nicht erzielen. Trotzdem die Versuche sehr oft angestellt wurden, ließ sich kein Nitrit nachweisen. Anscheinend waren bei der neutralen Reaktion, die bei dem Karbonatzusatz eintrat, die Bedingungen für eine Nitritbildung noch nicht gegeben.

---

[1]) Laurent. 1891. p. 722.
[2]) Ritter. 1911. p. 570.

Weiterhin wurde versucht, durch direkten Zusatz von Alkali zu den sauren Kulturen eine Reaktionsänderung und damit Nitritbildung herbeizuführen. Auch hier wurden Kulturen der beiden genannten Spezies, die sich in VII γ etwa 1 Tag entwickelt hatten, benutzt und dieser dann tropfenweise sterile, $^1/_{100}$ n-Natronlauge zugesetzt, bis die Reaktion soweit alkalisch war, daß noch eben Wachstum der Bakterien erfolgte. Als Indicator wurde Lackmus benutzt. Zufriedenstellende Resultate ließen sich auch auf diese Weise nicht erzielen. Allerdings gelang es, bei B. oxalaticus schwache Nitritbildung hervorzurufen, bei B. tumescens aber nicht.

Es blieb nun noch die Methode übrig, durch geeignete Auswahl der Kohlenstoffverbindungen die Bakterien selbst zu zwingen, eine gewünschte Reaktion herbeizuführen. Es ist dies möglich, da man die Erfahrung gemacht hat, daß die Kohlehydrate, vor allem Dextrose, bei der Zersetzung durch Bakterien sauere Reaktion der Nährlösung herbeiführen, die Salze der organischen Säuren umgekehrt alkalische. Man hat es daher in der Hand, je nach Belieben die Reaktion zu beeinflussen. Für Bakterien, die nur in sauren Lösungen zum Wachstum zu bringen sind, kann man dabei, wie es Ritter (1911 p. 571) bei seinen Pilzen gemacht hat, nur soviel Dextrose hinzufügen, daß deren Menge ungenügend ist und die Bakterien daher nach einer gewissen Zeit auch die durch Zerstörung des Kohlehydrats gebildete organische Säure angreifen müssen, worauf natürlich ebenso wie beim direkten Zusatz der Säure alkalische Reaktion sich einstellt. Für unsere Bakterien war dies Verfahren nicht nötig, da sie auch bei direktem Zusatz der organischen Salze zum Wachstum zu bringen waren, allerdings nur, wenn mit entwickelungskräftigem Oidienmaterial geimpft wurde. Zu den Versuchen wurde hier, wie schon oben gesagt, eine größere Zahl von Bakterien benutzt, nämlich B.

tumescens, B. oxalaticus, B. Petasites, B. megathaerium, B. silvaticus, B. luteus, und B. subtilis. Neben organischen Salzen wurden aber auch Glyzerin, Mannit und Milchzucker zu den Versuchen benutzt, und zwar immer so, daß nur einer dieser genannten Stoffe gleichzeitig in den Kulturen vorhanden war. Die betreffenden Nährlösungen hatten dann die Zusammensetzung 0,2 g Kaliumnitrat, 100,0 M-Nährlösung und dazu 1 g Natriumazetat, Natriumtartrat, Glyzerin, Mannit oder Milchzucker. Die Nährlösungen wurden nicht filtriert. Steril gemacht wurden sie durch dreimaliges Erhitzen im Dampftopf je ½ Stunde an 3 aufeinander folgenden Tagen. Die beiden Nährlösungen mit Natriumazetat und Natriumtartrat reagierten neutral, die anderen schwach sauer. Als Kulturgefäße dienten die schon früher beschriebenen Kölbchen. Untersucht wurde nur einmal, und zwar nach einer Entwickelungsdauer von 5 Tagen. Bezüglich der Methoden des Nitrit- und Ammoniaknachweises gilt das schon früher Gesagte. Ich habe die erzielten Resultate zunächst in einer Tabelle zusammengestellt und dabei zum Vergleich die mit Nährlösung VII γ nach derselben Zeit erzielten Resultate hinzugefügt (s. p. 409).

Wie die Tabelle zeigt, waren die hier erzielten Resultate, im Gegensatz zu den mit Calciumkarbonat und dem direkten Zusatz von Alkali, sehr zufriedenstellend. Die Annahme, daß bei Gegenwart von organischen Salzen die unter dem Einfluß der Dextrose saure Reaktion der Kulturen in alkalische umschlüge, bestätigte sich. Glyzerin und Mannit standen in ihrer Wirkung in der Mitte zwischen den organischen Salzen und der Dextrose, indem sie bald neutrale, bald sauere Reaktion auslösten. Der Milchzucker, der doch der Dextrose chemisch näher steht, als die anderen benutzten Stoffe, näherte sich in seiner Wirkung mehr den organischen Säuren, wenigstens bei der Mehrzahl der Bakterien. Was nun den Einfluß der Reaktion auf die Nitratreduktion betrifft, so ließen sich die Resultate von Ritter bestätigen. In allen Fällen, wo alkalische Reaktion eintrat, ließ sich bei den Bakterien, die in saurer Lösung Nitrit nicht aufspeicherten, dieses nachweisen, und zwar, je nach der Intensität der Reaktion, in mehr oder minder großer Menge. Weiterhin zeigte es sich aber auch, daß nicht nur bei der Nitrit-, sondern auch bei der Ammoniakaufspeicherung die Reaktion von großem Einfluß ist. Die Bakterien, die in saurer Lösung (VII γ) Ammoniak in großer Menge anhäuften, speicherten bei alkalischer Reaktion überhaupt keins auf. Es tritt hier das Umgekehrte wie beim Nitrit ein. Ammoniak ist in alkalischer Lösung nicht beständig. Es wird sich also aus den Kulturen verflüchtigen, wenn wir annehmen wollen, daß es überhaupt gebildet wird.

Bei dem Verhalten der Bakterien sind die drei verschiedenen Gruppen wie sie schon früher angedeutet sind, zu unterscheiden. Zunächst die Beeinflussung durch die Reaktion bei den Bakterien, die in Lösung VII γ, also bei saurer Reaktion, Nitrat zu Ammoniak reduzieren, ohne Nitrit als Zwischenprodukt aufzuspeichern. Es gehören hierher B. tumescens, B. oxalaticus und B. graveolens.

Bei diesen ist es wahrscheinlich, daß nur die saure Reaktion die Bildung von Ammoniak veranlaßt. Denn sobald diese alkalisch ist, ist Ammoniak nicht mehr nachzuweisen, dagegen Nitrit. Man kann sich hier die Tatsache der Nitrit- und Ammoniakaufspeicherung so erklären, daß die Bakterien in den gegebenen Nährlösungen für saure und alkalische Reaktion sehr empfindlich sind und darum die Säure oder das Alkali durch Ammoniak und Nitrit neutra-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle über den Einfluß der Reaktion der Nährlösung auf die Bildung von Nitrit und Ammoniak.

Name des untersuchten Bacillus	Zusammensetzung der Nährlösung 100,0 M. Nährlösung 0,2 g KNO_3 dazu 1,0 g	Intensität des Wachstums nach 5 Tagen	Reaktion der Kultur	Nitritbildung	Ammoniakbildung	Bemerkungen
B. tumescens	CH_3COONa	ziemlich stark	alkalisch	stark	—	—
	$C_4H_5O_6Na$	schwach	schwach alkalisch	schwach	—	—
	Glyzerin	ziemlich stark	neutral	—	schwach	—
	Mannit	stark	do.	—	stark	—
	Dextrose	sehr stark	sauer	—	—	—
	Milchzucker	schwach	schwach alkalisch	sehr ger.	sehr stark	— —
B. oxalaticus	CH_3COONa	sehr schwach	alkalisch	schwach	—	—
	$C_4H_5O_6Na$	—	—	—	—	—
	Glyzerin	stark	schwach sauer	—	stark	—
	Mannit	do.	do.	—	do.	—
	Dextrose	sehr stark	do.	—	sehr stark	—
	Milchzucker	schwach	neutral	ganz ger.	—	—
B. graveolens	CH_3COONa	sehr schwach	alkalisch	stark	—	1) gelber dick. Niederschlag mit Neßlers Reagens
	$C_4H_5O_6Na$	do.	neutral	ganz ger.	—	
	Glyzerin	stark	sauer	—	1)	
	Mannit	stark	sauer	—	stark	
	Dextrose	stark	sauer	—	stark	—
	Milchzucker	schwach	neutral	andeutungsweise	—	—
B. megathaerium	CH_3COONa	ziemlich stark	schwach alkalisch	stark	—	—
	$C_4H_5O_6Na$	schwach	do.	schwach	—	—
	Glyzerin	sehr stark	neutral	sehr schwach	ganz schwach	—
	Mannit	sehr stark	schwach sauer	do.	—	do.
	Dextrose	ziemlich stark	do.	—	—	—
	Milchzucker	sehr stark	schwach sauer	—	ganz schwach	—
B. silvaticus	CH_3COONa	ganz schwach	schwach alkalisch	schwach	—	—
	$C_4H_5O_6Na$	do.	neutral	schwach	—	—
	Glyzerin	stark	schwach sauer	—	stark	—
	Mannit	sehr stark	neutral	—	stark	—
	Dextrose	do.	sauer	—	—1)	1) gelber Niederschlag
	Milchzucker	stark	neutral	—	stark	
B. Petasites	CH_3COONa	ziemlich stark	alkalisch	schwach	—	In der Nährlösung mit Mannit entsteht mit Neßlers Regens ein dick. gelber Niederschlag
	$C_4H_5O_6Na$	schwach	schwach	sehr schwach	—	
	Glyzerin	ziemlich stark	alkalisch neutral	—	ganz schwach	
	Mannit	sehr stark	sauer	—	—	
	Dextrose	do.	schwach sauer	—	—	
	Milchzucker	stark	neutral	—	ganz schwach	
B. luteus	CH_3COONa	stark	alkalisch	stark	—	—
	$C_4H_5O_6Na$	sehr schwach	neutral	ganz schwach	—	—

Fortsetzung.

Name des untersuchten Bacillus	Zusammensetzung der Nährlösung 100.0 M. Nährlösung 0,2 g KNO_3 dazu 1,0 g	Intensität des Wachstums nach 5 Tagen	Reaktion der Kultur	Nitritbildung	Ammoniakbildung	Bemerkungen
B. luteus	Glyzerin	stark	neutral	—	—[1])	[1]) dicker gelber Niederschlag mit Neßlers Reagens
	Mannit	stark	neutral	—	schwach	
	Dextrose	sehr stark	neutral	—	—	
	Milchzucker	stark	neutral	ganz schwach	ganz schwach	
B. subtilis	CH_3COONa	—	—	—	—	—
	$C_4H_5O_6Na$	—	—	—	—	—
	Glyzerin	stark	neutral	sehr stark	schwach	—
	Mannit	stark	do.	do.	stark	—
	Dextrose	stark	do.	do.	stark	—
	Milchzucker	schwach	do.	ganz ger.	—	—

lisieren. Hierfür spricht auch das durch quantitative Versuche ermittelte Ergebnis, daß bei B. tumescens, im Gegensatz zu B. subtilis, die Menge des gespeicherten Ammoniaks gleichmäßig mit der Vermehrung des Bacillus fortschreitet.

Eine zweite besondere Gruppe bilden die Bakterien, die in VII γ, also in saurer Lösung, weder Nitrit noch Ammoniak bilden. Es gehören hierzu B. megathaerium, B. silvaticus, B. Petasites und B. luteus, wenigstens während des bei diesen Versuchen in Betracht kommenden Zeitraumes. Auch hier ist augenscheinlich der negative Ausfall der Nitritreaktion auf die saure Reaktion zurückzuführen. Bei der Ammoniakaufspeicherung scheint aber die Reaktion ohne Einfluß zu sein, dagegen die Art der Kohlenstoffquelle eine Rolle zu spielen. Am deutlichsten zeigt sich dies bei B. silvaticus; hier ist bei Gegenwart von Mannit und Glyzerin Ammoniak in großer Menge vorhanden, trotzdem die Reaktion nur schwach sauer bzw. neutral ist, gegenüber saurer bei Gegenwart von Dextrose. Man könnte allerdings auf den ersten Blick annehmen, daß der dicke, gelbe Niederschlag, der mit dem Destillat einer in VII γ gewachsenen Kultur von B. silvaticus entsteht, ev. vorhandenes Ammoniak verdecke. Es ist dies aber tatsächlich nicht der Fall. Ammoniak wird nicht aufgespeichert, wie Versuche, die nach der bei quantitativen Bestimmungen benutzten Methode ausgeführt wurden, ergaben. Man muß also annehmen, daß bei diesen 3 Bakterien die Art der Kohlenstoffquelle bestimmend auf die Ammoniakaufspeicherung einwirkt.

Von einer Untersuchung der dritten Gruppe von Bakterien, solchen, die in Nährlösung VII γ. Nitrat scheinbar nur bis zum Nitrit reduzierten, wurde abgesehen, da deren Wachtumsintensität in allen Fällen so schwach ist, daß sich eingehende Versuche mit ihnen nicht anstellen ließen. Daß auch bei ihnen das Nitrat bis zum Ammoniak reduziert wird, ergibt sich schon daraus, daß diese Bakterien in der Nährlösung VII γ wachsen, wozu sie notwendigerweise Ammoniak bilden müssen. Eine ähnliche Erscheinung haben wir bei den in den Tabellen aufgeführten Bakterien bei der Züchtung in Nährlösung mit organischen Salzen. Auch hier wird das Nitrat scheinbar nur bis zum Nitrit reduziert, trotzdem die Bakterien unter anderen Bedingungen Ammoniak in großen Mengen aufspeichern.

In der Tabelle ist dann noch B. subtilis angeführt. Er wurde zu den Untersuchungen herangezogen, um auch den Einfluß der Reaktion auf den Typus von Bakterien festzustellen, die sowohl Nitrit wie Ammoniak aufspeichern. Leider konnte hierüber nichts festgestellt werden, da der Bacillus in den Nährlösungen mit Natriumazetat und Natriumtartrat nicht zum Wachsen kam und in den anderen Lösungen dieselbe Reaktion wie in VII γ herrschte.

b) Einfluß der das Nitrat absättigenden Base auf die Reduktion.

Angaben über den Einfluß, den die Art des zugesetzten Nitrats auf die Reduktion ausübt, sind nur wenige gemacht. Maassen gibt an, daß sich die einzelnen Bakterien äquivalenten Mengen von Kalium- und Natriumnitrat gegenüber verschieden verhielten. Die einen, z. B. B. pestis, B. astaci, B. pyocyaneus, vertrugen das Kaliumnitrat, andere, z. B. Vibrio cholerae asiaticae, Vibrio Dunbar phosphorescens, das Natriumnitrat besser. Von den einzelnen Forschern, die sich mit der Nitratreduktion beschäftigten, wurde am meisten Kaliumnitrat, daneben auch Natriumnitrat benutzt. Einige, wie Frankland und Heraeus, benutzten Calciumnitrat. Ein allzu großer Unterschied war bei Verwendung der einzelnen Nitrate nicht zu erwarten, wie ja auch aus den Angaben von Maassen hervorgeht. Immerhin war es aber doch möglich, daß die Art der Base, die die Salpetersäure absättigt, nicht ohne Einfluß auf die Nitratzersetzung sein werde.

Bei den Versuchen wurden Kaliumnitrat, Natriumnitrat und Calciumnitrat benutzt; letzteres, nachdem es vorher getrocknet worden war. Als Nährlösung diente VII γ, die also bei den Versuchen mit Kaliumnitrat unverändert blieb, während bei den beiden anderen statt dessen äquivalente Mengen N, also 0,169 g Natriumnitrat und 0,164 g Calciumnitrat verwendet wurden. Die Nährlösungen wurden nicht filtriert, waren infolgedessen getrübt, und zwar die mit Calciumnitrat am stärksten. Sie reagierten alle für Lackmuspapier schwach sauer. Bezüglich der Sterilisation der benutzten Kulturgefäße, der Lösungsmenge und des Nitrat- und Nitritnachweises gilt das im Kapitel 1 Gesagte. Benutzt wurden zu den Versuchen B. tumescens, B. oxalaticus, B. Petasites, B. subtilis und B. megathaerium, da von diesen Spezies am ehesten ein verschiedenes Verhalten den Nitraten gegenüber zu erwarten war. Geimpft wurden immer zwei Ösen voll Stäbchen und Sporenmaterial von einer auf D-Agar gewachsenen Kultur. Nach einer Entwickelungszeit von 5 Tagen wurden die Kulturen auf Reaktion, Wachstum, Nitrit und Ammoniakbildung untersucht. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Die Versuche mit VII γ sind dabei nur zur Übersicht hinzugesetzt.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, waren wesentliche Unterschiede in dem Verhalten der einzelnen Bakterien nicht vorhanden. Die die Salpetersäure absättigende Base scheint also bei der Reduktion ziemlich gleichgültig zu sein (s. p. 412).

Kalium und Natrium sind, von ganz unwesentlichen Änderungen abgesehen, von genau gleicher Wirksamkeit. Nur das Calciumnitrat war in einigen Fällen von geringerer Wirksamkeit. Es bezieht sich das besonders auf B. tumescens und B. oxalaticus, also die beiden, bei welchen

Tabelle über den Einfluß der im Nitrat enthaltenen Basen auf die Nitratreduktion.

Name des untersuchten Bakteriums	Zusammensetzung der Nährlösung 1 % Dextrose 100,0 M. Nährlösung dazu	Intensität des Wachstums	Reaktion der Kultur	Bildung von Nitrit	Bildung von Ammoniak	Bemerkungen
Bac. megathaerium	KNO_3	stark	schwach sauer	nicht vorhanden	nicht vorhanden	—
	$NaNO_3$	stark	do.	do.	ganz gering	—
	$Ca(NO_3)_2$	schwach	do.	do.	do.	—
Bac. oxalaticus	KNO_3	sehr stark	sauer	nicht vorhanden	stark	Bei $NaNO_3$ ist das Wachstum etwas stärker als bei KNO_3
	$NaNO_3$	sehr stark	do.	do.	do.	
	$Ca(NO_3)_2$	schwach	do.	do.	ganz gering	
Bac. Petasites	KNO_3	sehr stark	schwach sauer	nicht vorhanden	nicht vorhanden	—
	$NaNO_3$	sehr stark	do.	do.	do.	—
	$Ca(NO_3)_2$	stark	do.	ganz schwach	do.	—
Bac. subtilis	KNO_3	stark	neutral	stark	stark	Bei $NaNO_3$ ist Ammoniak am stärksten vorhanden
	$NaNO_3$	do.	do.	do.	sehr stark	
	$Ca(NO_3)_2$	do.	schwach alkalisch	do.	stark	
Bac. tumescens	KNO_3	stark	sauer	nicht vorhanden	sehr stark	—
	$NaNO_3$	stark	schwach sauer	do.	do.	—
	$Ca(NO_3)_2$	schwach	schwach sauer	do.	schwach	—

infolge der sauren Reaktion der Nährlösung das Nitrat direkt in Ammoniak umgewandelt wird. Ob nun das Calciumnitrat eine schlechtere Nährquelle für diese Bakterien darstellt, oder ob das schwache Wachstum dadurch verursacht wird, daß Calciumhydroxyd, das eine viel schwächere Base wie Kalium- und Natriumhydroxyd ist, die bei der Reduktion durch die Bakterien gebildete Säure nicht abzusättigen vermag und daher ein weiteres Wachstum unterbleiben muß, ist nicht sicher festzustellen. Wahrscheinlich ist aber das letztere. Denn, wie sich aus den Versuchen über den Einfluß der Reaktion sowie aus den quantitativen Bestimmungen ergeben hat, ist die bei diesen Bakterien gebildete Ammoniakmenge direkt von der Reaktion abhängig. Und da auch in den Kulturen bei Gegenwart von Calciumnitrat viel weniger Ammoniak gebildet ist, als sonst, so spricht dies für die letztere Deutung. Bei den anderen Bakterien verhielt sich das Calciumnitrat den beiden anderen fast ganz gleich. Nur bei B. megathaerium ist noch eine Änderung vorhanden, insofern als auch hier das Wachstum bei Gegenwart von Calciumnitrat schwächer war.

Das Ergebnis der Versuche zeigt große Ähnlichkeit mit denen, die Fred mit denitrifizierenden Bakterien erzielt hat. Auch er kommt zum Resultat, daß die an die Salpetersäure gebundene Base auf den Verlauf der Salpetersäureumsetzung keinen Einfluß ausübt.

3. Kapitel.

Quantitative Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Bakterienwachstum, Nitratreduktion, Nitrit- und Ammoniakbildung.

Quantitative Bestimmungen über die bei der Reduktion umgesetzten Nitratmengen sowie über die Menge des dabei gebildeten Nitrits und Ammoniaks sind eine ganze Reihe ausgeführt. Schon die ersten, die die Nitratreduktion an Reinkulturen studierten, Hayon und Dupetit[1]), machten solche. Ebenso macht Frankland[2]) für seine salpeterreduzierenden Bakterien quantitative Nitrat-, Nitrit- und Ammoniak-Bestimmungen; auch Stoklasa (1898 p. 285 ff.) Stoklasa und Vítek und Fichtenholz[3]) und in jüngster Zeit Franzen und Löhmann[4]) haben die bei der Nitratreduktion gebildeten Umsetzungsprodukte zahlenmäßig festgelegt. Alle diese Untersuchungen haben das Gemeinsame, daß sie die Beziehungen, die das Wachstum der Bakterien zu der Nitratzersetzung der Nitrit- und Ammoniakbildung hat, nicht berücksichtigen. Wir erhalten also dadurch keine Aufklärung, ob z. B. die Menge des reduzierten Nitrates nur vom Wachstum abhängt, oder ob den einzelnen Bakterien eine besondere nitratreduzierende Kraft innewohnt. Derartige Fragen können nur beantwortet werden, wenn die quantitativen Untersuchungen mit einer Feststellung der Zahl der vorhandenen Bakterien verbunden sind. Solche Untersuchungen sind über den Prozeß der Nitratreduktion noch nicht angestellt worden. Es erschien darum Herrn Professor Meyer wünschenswert, daß einige derartige Versuche gemacht wurden, um Veranlassung zu geben, daß diese Art der Untersuchung auch auf andere Gebiete übertragen würde.

Zu den Untersuchungen wurde B. subtilis, B. tumescens und B. Petasites verwandt, also Vertreter von Bakteriengruppen, die bei der Nitratreduktion sich verschieden verhalten; B. subtilis speichert sowohl Nitrit wie Ammoniak, B. tumescens nur Ammoniak und B. Petasites keines von beiden auf, wenigstens nicht während der hier benutzten Entwicklungsdauer. Außerdem war bei der Wahl der genannten Spezies noch maßgebend, daß ihre Sporen in der benutzten Nährlösung leicht keimten. Um eine möglichst gleichmäßige Entwicklung zu erhalten, wurde immer von abgekochten Sporen ausgegangen. Die Ermittlung der mittleren Keimzeit, die bei den Versuchen von der Wachstumsdauer in Abzug gebracht werden mußte, geschah in folgender Weise: Die abgekochten Sporen wurden in die Nährlösung VII γ gebracht und festgestellt, wann die ersten Sporen gekeimt waren. Ebenso wurde der Zeitpunkt, wo sämtliche Sporen ausgekeimt waren, ermittelt und aus diesen beiden Daten dann das Mittel genommen. Dieser Zeitpunkt gilt als mittlere Keimzeit und wurde bei der Berechnung in Abzug gebracht. Als Nährlösung wurde die auch zu den qualitativen Untersuchungen benutzte Lösung VII γ gewählt. Die Art der Herstellung war aber hier etwas verschieden. Zunächst wurde eine M-Nährlösung angefertigt, welche dieselbe Menge Salze wie die gewöhnliche, aber auf je 100 ccm 5 ccm Wasser weniger enthielt. Diese Lösung wurde erhitzt, filtriert, 190 ccm davon in den Kulturkolben gebracht, 2 g Dextrose und 10 ccm einer 4-proz. Kaliumnitratlösung hinzugefügt. In allen Fällen war den Bakterien also 0,4 g Kaliumnitrat geboten. Die Herstellung und Abmessung der Kaliumnitratlösung war quantitativ genau. Die Kulturen wurden angesetzt in Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas von ca. 900 ccm Inhalt, die in ihrer Gestalt genau den bei den qualitativen Versuchen benutzten Kölbchen entsprachen, und so den Bakterien gleiche Sauerstoffverhältnisse boten. Zur Sterilisation wurden die Kolben nach dem Einfüllen der Nährlösung an 3 aufeinander folgenden Tagen je 30 Minuten im Dampftopf erhitzt.

---

[1]) Hayon u. Dupetit. 1882.

[2]) Frankland. 1889. p. 382.

[3]) Fichtenholz. 1899.

[4]) Franzen u. Löhmann. 1909.

Um gleiche Bedingungen zu bieten, wurde in allen Fällen eine Million Sporen als Impfmaterial benutzt. Hierzu wurde eine Sporenmischung hergestellt, die darin befindlichen Bakterien gezählt und dann soweit verdünnt, daß in 1 ccm genau 1 Million Sporen enthalten war. Von dieser Verdünnung wurde mit einer im Heißluftschrank sterilisierten 1 ccm Pipette 1 ccm entnommen, in die Kolben gebracht und diese sodann in das Brutzimmer bei 28° C gestellt. Immer wurde ein ungeimpfter Kolben zur Kontrolle dabei gestellt. Da die Kolben mit Wattebausch verschlossen waren, so konnte Verdunstung stattfinden, vor allem war nicht außer acht zu lassen, daß sich Ammoniak verflüchtigen konnte. Wie aber Versuche mit B. subtilis ergaben, bei denen die Gefäße mit Korkstopfen durch die ein mit titrierter Schwefelsäure angefülltes Röhrchen führte, verschlossen waren, ließ sich nicht nachweisen, daß Ammoniak verdunstete. Bei B. tumescens und B. Petasites war ohnehin wegen der sauren Reaktion der Kulturen Ammoniakverdunstung ausgeschlossen. Zur Untersuchung wurden die Kulturen aus dem Brutzimmer in Wasser von 15° C gebracht, darin gelassen, bis sie diese Temperatur angenommen hatten, dann in einen Meßkolben von 250 ccm Inhalt gebracht und bis zur Marke aufgefüllt. Nachdem alles gründlich durchmischt war, wurden die zu den einzelnen Bestimmungen erforderlichen Mengen entnommen und, um weiteres Wachstum unmöglich zu machen, mit den für die einzelnen Bestimmungen nötigen Reagentien versetzt und möglichst bald untersucht. Die Art der Nitrat-, Nitrit- und Ammoniakbestimmung sowie der Bakterienzählung ist ausführlich in dem Kapitel „Methoden“ auseinandergesetzt.

Die bei den Versuchen erzielten Resultate sind auch hier zur Übersichtlichkeit, sowie um Wiederholungen zu vermeiden, in Form von Tabellen zusammengefaßt. Wie die Untersuchungen im einzelnen vor sich gingen, sei an einem Beispiel gezeigt. Es ist dazu B. subtilis nach einer Entwickelungsdauer von 72 Stunden gewählt:

1. Sporenzählung zum Impfen.

Von der Lösung, in der sich die abgekochten Sporen befanden, wurde 1 ccm entnommen, mit 5 ccm H_2SO_4 (1 : 10) und 1 ccm Methylenblau (1 : 10) versetzt. Ein Teil der ursprünglichen Sporenmischung ist also auf 7 Teile verdünnt.

Beim Zählen dieser Verdünnung fanden sich:

auf 200 Feldern . . . . 152 Sporen
auf 200 Feldern . . . . 190 Sporen
Mittel 342 : 2 = 171 Sporen

Dies ergibt für ein Feld 171 : 200 = 0,855 Sporen, für 1 ccm 0,855 · 4 000 000 = 3 420 000 Sporen und für 1 ccm der ursprünglichen Sporenmischung 3 420 000 · 7 = 23 940 000 Sporen.

Zum Impfen wurde 1 ccm hiervon auf 23,94 ccm verdünnt, so daß also in 1 ccm genau 1 Million Sporen enthalten war.

2. Untersuchung nach 72 Stunden.

Stäbchenzählung.

Von der auf 250 ccm aufgefüllten Kultur wurde 1 ccm entnommen, mit 1 ccm Kupferoxydammoniak versetzt, 5 Stunden stehen gelassen, dann 26 ccm 5 Proz. H_2SO_4 und 2 ccm 10 Proz. Methylenblaulösung hinzugefügt und gezählt.

1 ccm der Kultur ist verdünnt auf 30 ccm.
Auf 200 Feldern fanden sich 357,0 Stäbchen
„ 200 „ „ „ 382,0 „

Mittel 200 Felder 739,0 : 2 = 369,5 Stäbchen.

Auf einem Felde fanden sich also im Durchschnitt 1,8475 Stäbchen und in 1 ccm der Verdünnung 1,8475 . 4 000 000 = 7 390 000 Stäbchen. Auf die ganze Kultur umgerechnet ergibt dies eine Gesamtmenge der vorhandenen Stäbchen von 7 390 000 . 30 . 250 = 55 425 000 000. Eine Million Sporen hat sich also in 72 Stunden auf 55 425 000 000 Stäbchen vermehrt.

Nitratbestimmung.

20 ccm der Kultur wurden auf 200 ccm verdünnt, hiervon 2 ccm genommen, in einen Meßkolben gebracht, mit 2 ccm NaCl und 10 ccm Eisessig versetzt und auf 100 ccm aufgefüllt. Von dieser Mischung wurde jedesmal 1 ccm zur kolorimetrischen Bestimmung verwandt.

Bei sechs Bestimmungen war Farbengleichheit vorhanden:
2 mal bei Skalenpunkt 47,
2 „ „ „ 43,
2 „ „ „ 39.

Im Mittel also 129 : 3 = 43.

Nach der Kurve entspricht die Zahl 43 einer Kaliumnitratmenge von 0,2302 mg in 100 ccm. In den zur Bestimmung verwandten 20 ccm der Kultur sind also enthalten 0,02 302 . 100 . 10 = 23,02 mg und in der ganzen Kultur 23,02 . 12,5 = 287,8 mg. Da im ganzen 400 mg vorhanden waren, so haben die Bakterien also 112,2 mg Kaliumnitrat verbraucht.

Nitritbestimmung.

Hierzu wurde 1 ccm der Kultur mit 1 ccm Reagens versetzt, mit Wasser verdünnt und erhitzt. Gleichzeitig wurden 2 ccm der Normalnitritlösung, die 0,01 mg N_2O_3 im Kubikzentimeter enthielt, in derselben Weise behandelt. Die beiden Lösungen wurden dann in die Zylinder des Kolorimeters gebracht und verglichen. Anfangsstand der Normallösung 10,00.

Um Farbengleichheit mit der zu prüfenden Lösung herzustellen, mußten ausgelassen werden:
Bei 1 Versuch auf 7,10 ccm,
„ 2 „ „ 7,00 „ ,
„ 3 „ „ 7,80 „ .

Im Mittel war also bei 21,90 : 3 = 7,30 Farbengleichheit vorhanden.

Da in den 10,00 ccm 0,02 mg N_2O_3 vorhanden waren, so enthielten diese 7,30 ccm $\frac{7,30 \,.\, 0,02}{10,00}$ = 0,014 60 mg N_2O_3 und die ganze Kultur 250 mal mehr also 3,65 mg N_2O_3.

Auf Kaliumnitrat umgerechnet haben die Bakterien also 9,711 mg KNO_3 in Form von Nitrit aufgespeichert.

Ammoniakbestimmung.

Hierzu wurden 20 ccm der Kultur entnommen und in der bei Kapitel „Methoden“ beschriebenen Weise auf Ammoniak geprüft.

In einem Versuch wurden verbraucht 0,15 ccm $^1/_{10}$ n H_2SO_4, in einem zweiten Versuch 0,15 ccm $^1/_{10}$ n H_2SO_4.

Auf die ganze Kultur umgerechnet, entspricht dies einer Menge von 1,875 ccm $^1/_{10}$ n H_2SO_4.

Die vorhandene Ammoniakmenge berechnet sich daraus zu 1,975 . 0,0017 = 0,0032 mg in Ammoniak in 250 ccm. Auf Kaliumnitrat umgerechnet, haben die Bakterien also 0,019 g KNO_3 in Form von Ammoniak aufgespeichert.

In ähnlicher Weise wurden alle anderen Bestimmungen ausgeführt.

Quantitative Untersuchung von B. subtilis.

Die zum Impfen benutzten Sporen waren 2 Minuten bei 100° abgekocht. Als mittlere Keimungszeit sind 18 Stunden in Abzug gebracht. Sämtliche in der Tabelle angegebenen Daten sind auf die ganze Kultur bezogen.

Entwicklungsdauer in Stunden	Menge der vorhandenen Stäbchen in Millionen	Menge des verbr. Kaliumnitrats		Menge d. vorh. Nitrits als N_2O_3	Menge des vorh. Nitrits ausgedrückt in Kal.-Nitrat		Menge d. vorh. Ammoniaks als NH_3	Menge des vorh. Ammoniaks ausgedrückt in Kaliumnitrat		Bemerkungen
		in g	in %	in mg	in g	in %		in g	in %	
46	15 710	0,0115	2,87	1,00	0,0027	0,67	—	—	—	
72	39 3875	0,0767	19,02	In Spuren			0,0053	0,0316	7,90	
94	55 425	0,1122	28,05	3,65	0,0097	2,43	0,0032	0,0190	4,75	
142	55 200	0,3129	78,24	0,84	0,0022	0,59	0,0456	0,2360	58,91	

Bacillus subtilis.

Verhältnis von Bakterienwachstum zur

Nitritaufspeicherung

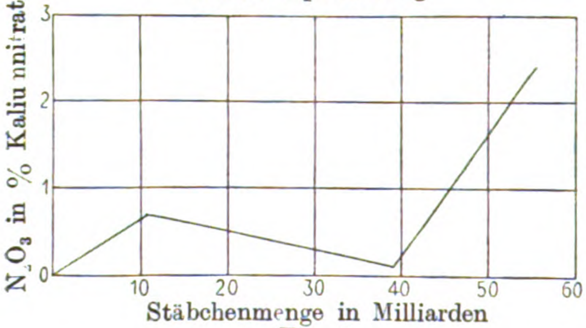


Fig. 5.

Ammoniakaufspeicherung

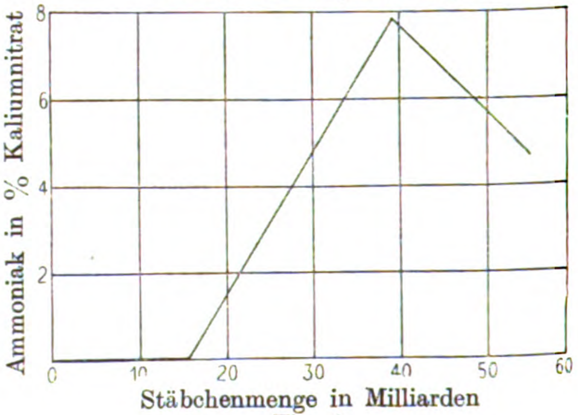


Fig. 6.

Wie sich aus der Tabelle ergibt, wächst die Menge des verbrauchten Kaliumnitrats ziemlich gleichmäßig mit der Vermehrung der Bakterien, nur im Anfang ist die Menge des zersetzten Kaliumnitrats etwas geringer als später. In der nebenstehenden Kurve ist das Verhältnis von Vermehrungsgröße zur Menge des verbrauchten Kaliumnitrats graphisch dargestellt. Von dem gebotenen Kaliumnitrat (0,4 g) wird etwa ein Fünftel (20,87 Proz.) von den Bakterien zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwendet, wenn man annimmt, daß sämtliches, verschwundenes Kaliumnitrat von den Bakterien zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs verwendet wird. Ob dies wirklich der Fall ist, ist ungewiß, da außer dem Nitrit und Ammoniak auch noch andere stickstoffhaltige Stoffe in den Kulturen vorhanden sein könnten. Untersuchungen darüber wurden nicht angestellt.

Wie aus der letzten Reihe der Tabelle zu ersehen ist, steht die Nitratzersetzung nicht still, wenn die Entwicklung der Bakterien aufhört.

Die Menge des von B. subtilis aufgespeicherten Nitrits ist ziemlich gering, dabei ist ein Schwanken in der Menge des Nitrits vorhanden, wie dies noch besonders deutlich aus nebenstehender Kurve (Fig. 5—7) ersichtlich ist, wo das Verhältnis von Bakterienmenge zur Menge des gebildeten Nitrits dargestellt ist. Die Nitritaufspeicherung ist also von der Vermehrung der Bakterien unabhängig. Seine Menge richtet sich nach den jeweilig vorhandenen Bedingungen, wobei, wie früher ausgeführt, besonders die Reaktion der Nährlösung eine Rolle spielt.

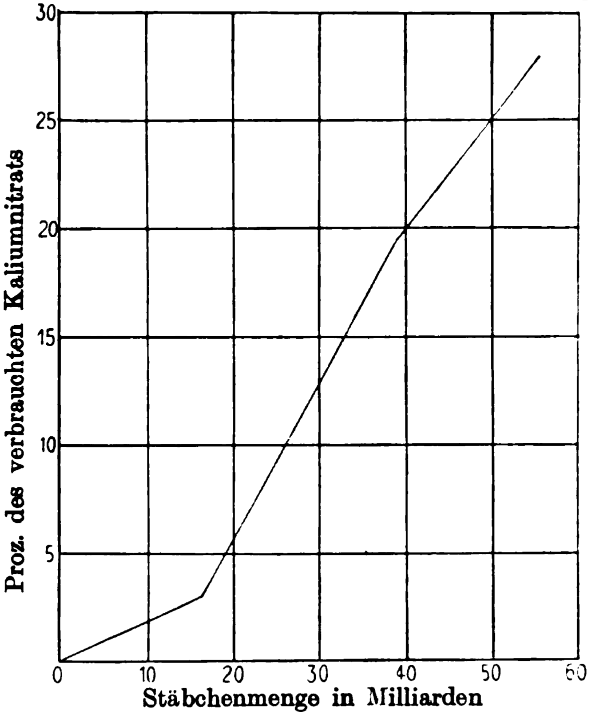

Bacillus subtilis.
Verhältnis von Wachstum zur Nitratzersetzung

Fig. 7.

Auch bei der Ammoniakaufspeicherung ist ein Einfluß des Bakterienwachstums nicht zu bemerken. Wie aus der Tabelle und aus der nebenstehenden Kurve hervorgeht, ist auch hier die gebildete Menge wechselnd. Die große Menge Ammoniak, welche in der letzten Reihe der Tabelle verzeichnet ist, zeigt, daß wir es bei B. subtilis mit einem starken Ammoniakbildner zu tun haben.

Quantitative Untersuchung von B. tumescens.

Die zum Impfen benutzten Sporen waren 1 Minute bei 100° abgekocht. Als mittlere Keimzeit sind 19 Stunden in Abzug gebracht. Alle Angaben beziehen sich auf die ganze Kultur.

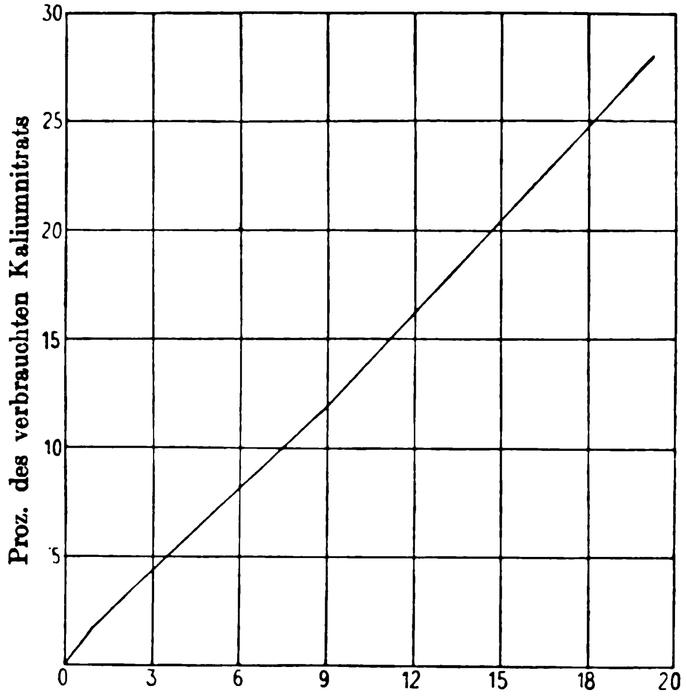
S. Tabelle auf p. 418.

Wie bei B. subtilis, so wächst auch bei B. tumescens die Menge des verbrauchten Kaliumnitrats regelmäßig mit dem Wachstum, wie dies auch aus nebenstehender Kurve ersichtlich ist (Fig. 8—9).

Entw.-Dauer in Std.	Menge der vorhandenen Stäbchen in Mill.	Menge des verbrauchten Kaliumnitrats in g	Menge des verbrauchten Kaliumnitrats in %	Nitritbildung	Menge des vorhandenen Ammoniaks als NH_3	Menge des vorhandenen Ammoniaks ausgedrückt in Kaliumnitrat in g	Menge des vorhandenen Ammoniaks ausgedrückt in Kaliumnitrat in %
25	795	0,0075	1,88	—	In Spuren		
49	8887,5	0,0473	11,75	—	0,0038	0,0228	5,70
93	20231,25	0,1123	28,01	—	0,0104	0,0618	15,45

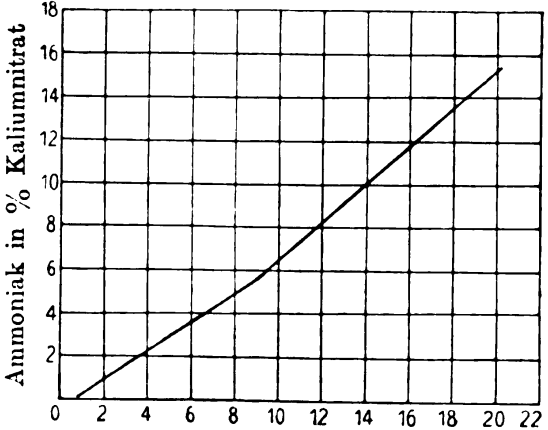
Bacillus tumescens.

Verhältnis von Bakterienwachstum zur Menge des verbrauchten Kaliumnitrats.



Stäbchenmenge in Milliarden
Fig. 8.

Verhältnis von Bakterienwachstum zu Ammoniakaufspeicherung.



Stäbchenmenge in Milliarden
Fig. 9.

Quantitative Untersuchungen von B. Petasites.

Die zum Impfen benutzten Sporen waren 1 Minute bei 100° abgekocht. Als mittlere Keimzeit sind 19 Stunden in Abzug gebracht. Alle Angaben beziehen sich auf die ganze Kultur.

Entwickl.-dauer in Std.	Menge der vorhandenen Stäbchen in Mill.	Menge des verbrauchten Kaliumnitrats in g	Menge des verbrauchten Kaliumnitrats in %	Nitritbildung	Ammoniakbildung	Bemerkungen
28	587,5	0,0010	2,50	—	—	
45	4850,0	0,0840	21,0	—	—	
77	11166	0,0960	24,0	—	—	

Bacillus Petasites.

Verhältnis von Bakterienwachstum zur Menge des verbrauchten Kaliumnitrats.

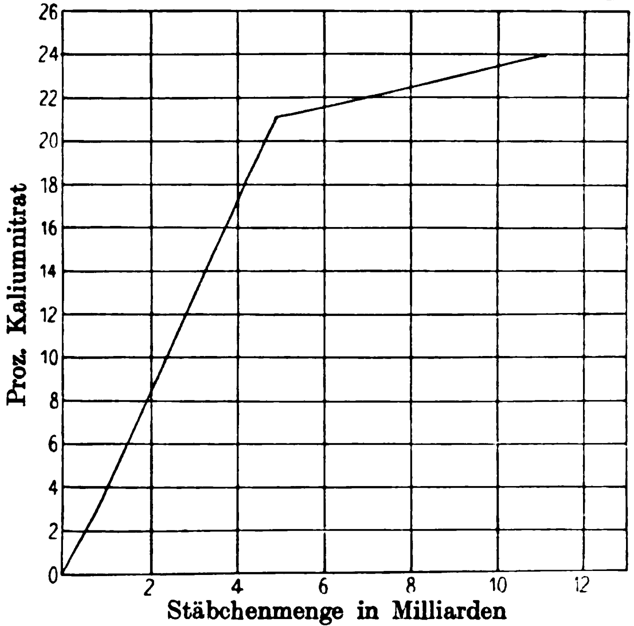


Fig. 10.

4. Kapitel.

Die physiologische Bedeutung der Nitratreduktion für die Bakterienzelle und der Verlauf des Reduktionsprozesses.

Worin die physiologische Bedeutung der Nitrat- und Nitritreduktion besteht, ist bis jetzt noch nicht sicher festgestellt. Leone, dessen Ansicht auch von Hjalmar Jensen in Lafars Handbuch zitiert wird, nimmt an, daß sie lediglich erfolge, um die Bakterienzelle mit Sauerstoff zu versehen. Er schließt dies aus Versuchen mit Bakterienkulturen, die mit und ohne Kaliumnitratzusatz gleiche Mengen Ammoniak bildeten, während sich bei Gegenwart von Nitraten ungefähr die daraus berechnete Menge Stickstoff erhalten ließ. Ich kenne die Arbeit nur aus dem Referat im Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, das nur sehr kurz gefaßt ist. Augenscheinlich hat Leone es aber mit Denitrifikationsbakterien zu tun gehabt. Auch scheint er neben Nitrat noch eine andere Stickstoffquelle in der benutzten

Nährlösung gehabt zu haben. Seine Angaben sind also für die Auffassung der physiologischen Bedeutung der Nitratreduktion wertlos. Aus den Versuchen von Laurent, der angibt, daß bei der Nitratreduktion die Bakterien ohne freien Sauerstoff leben könnten, und aus denen von Marchal, der fand, daß B. mycoides in einer nitratfreien Nährlösung streng aërob, in einer solchen mit Nitrat aber auch anaërob sich entwickeln könne, könnte man schließen, daß die Nitratreduktion der Bakterienzelle freien Sauerstoff liefere, also aus energetischen Gründen erfolge. Beide Angaben sind aber nicht ganz stichhaltig, da die Autoren keine näheren Versuchsbedingungen angaben, vor allem nicht, wie stark die Luftverdünnung war, bei der sie gearbeitet haben. Auch die Bemerkung von Maassen, daß die Reduktion der Nitrate zu Nitriten sowohl bei Sauerstoffabschluß vor sich ging, wie bei Sauerstoffzutritt, besagt nicht viel, da auch hier die näheren Angaben fehlen. Ebenso ist die Schlußfolgerung von Maassen, daß die Reduktion der Nitrate in der Regel den Bakterien nicht als Mittel zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs dient, daß sie vielmehr eine Umsetzung sei, die für die Energieentwicklung von Bedeutung ist, und mehr zum dynamogenen als zum plastischen Teil des Stoffwechsels gehört, fraglich, da die Versuche, auf die Maassen diese Folgerung aufbaut, fast nur an Lösungen gewonnen sind, in denen neben Nitrat noch Pepton vorhanden war. Die Ergebnisse, die er mit 27 Bakterienarten erhielt, die er in eiweißfreier Nährlösung nur mit Nitrat als Stickstoffquelle züchtete, wobei sämtliche Bakterien zum Wachsen kamen und das Nitrat mehr oder weniger stark zu Ammoniak reduzierten, sprechen nicht für diese Ansicht, sondern eher für das Umgekehrte.

Die Ansicht, daß bei der Nitratreduktion nicht der Sauerstoff des Nitrats eine Rolle spiele, vertritt Takahaschi. Er kommt dazu durch Versuche, die er mit B. pyocyaneus, B. mesentericus vulgatus, Proteus vulgaris, B. mesentericus fuscus und B. typhimurium anstellte. In Bouillon mit Zusatz von Natriumnitrit wuchsen alle diese Bakterien nur so kümmerlich, daß an eine Verwertung des Nitrits als Sauerstoffquelle nicht zu denken war.

Um zu einer Lösung der Frage nach der physiologischen Bedeutung der Nitratreduktion zu kommen, ist es zunächst nötig, die Beziehungen des Sauerstoffs zur Reduktion festzustellen. Untersuchungen hierüber sind zwar, wie vorher angegeben, gemacht, aber noch nicht beweiskräftig genug.

Um die Beziehungen einwandfrei festzustellen, ist es notwendig, die Bakterien bei einem solchen Sauerstoffdrucke zu züchten — von dem Einfluß, den ein vermehrter Sauerstoffzutritt auf die Nitratreduktion ausübt, soll hier keine Rede sein —, daß auf den gebräuchlichen Nährböden Peptonagar-, Gelatine- usw. Wachstum nicht erfolgt. Tritt bei derselben Sauerstoffspannung noch Entwicklung in den Nährlösungen mit Nitraten oder Nitriten ein, so ist damit bewiesen, daß der Sauerstoff der Nitrate den Bakterien zur Deckung des Sauerstoffbedarfs dient. Für diese Untersuchungen war es bequem, daß durch die Arbeiten von Wund das Sauerstoffminimum einer jeden unserer Spezies bekannt war.

Zu den Versuchen wurden nur Bakterien ausgesucht, die gut in Nährlösung mit Kaliumnitrat (VII γ) wuchsen, da von den anderen überhaupt nicht zu erwarten war, daß sich positive Resultate damit erzielen ließen. Benutzt wurden die folgenden acht: B. asterosporus, B. graveolens, B. megathaerium, B. oxalaticus, B. Petasites, B. simplex, B. subtilis und B. tumescens. Als Nährsub-

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

strate wurde benutzt D-Agar, in der Zusammensetzung, wie er in dem Praktikum von A. Meyer angegeben ist, VII γ und VIII β. In letzterer wurde aber nur B. tumescens und B. subtilis gezüchtet. Die Bereitung der Nährlösungen geschah genau so, wie früher angegeben. Benutzt wurden zu den Versuchen Reagenzröhrchen von 12 cm Länge und 1 cm Durchmesser, von denen jedes etwa 3 ccm Nährlösung erhielt. Zur anaëroben Züchtung wurden die von A. Meyer (1905. p. 337) eingeführten Vakuumexsikkatoren benutzt. Die Röhrchen wurden mit reichlichen Mengen von entwicklungskräftigem Stäbchenmaterial geimpft und dann mit den Agarröhrchen, die auf dieselbe Weise geimpft waren, in die Kulturvakua gebracht. Diese wurden dann soweit wie möglich ausgepumpt; zum Absorbieren des noch übrigbleibenden Sauerstoffs wurden einige gut wachsende Kulturen von B. asterosporus mit in den Exsikkator gebracht, und dieser dann bei 28° in den Brutraum gestellt, wobei, sobald die Temperatur im Vakuum auf 28° gestiegen war, der Barometerstand abgelesen wurde. Dasselbe geschah auch bei Beendigung des Versuchs. Immer geschah die Züchtung im wasserdampfgesättigten Raum. Es wurden mehrere Versuche gemacht, bei denen das Resultat sich ziemlich gleich blieb. Ich führe hier nur einen an: Dauer des Versuchs 1 Woche. Stand des Barometers am Anfang ca. 20 mm = 7 mg Sauerstoff im Liter. Stand des Barometers am Schluß 30 mm = 11 mg Sauerstoff im Liter. Keine der Kulturen, mit Ausnahme von B. asterosporus, zeigte eigentliches Wachstum. Die Nährlösungen waren noch vollkommen klar. Mikroskopisch ließen sich zwar Stäbchen erkennen, aber nur in solchen Mengen, daß sie wohl nur die geimpften darstellten. Auch auf D-Agar zeigte sich in keinem Falle Entwicklung als wie bei B. asterosporus, wo dies ja auch nicht anders zu erwarten war. Das Wachstum von B. asterosporus in Nährlösung VII γ war sehr schwach, Nitrit stark vorhanden. Es entspricht dies seinem Verhalten bei anaërobem Wachstum.

Aus den Versuchen geht also hervor, daß der Sauerstoff der Nitrate und Nitrite den reduzierenden Bakterien den freien Sauerstoff der Luft nicht zu ersetzen vermag. Wir haben es also in der Reduktion der Nitrate zu Nitrit und Ammoniak wohl kaum mit einem dynamogenen Prozeß zu tun. In der Hauptsache handelt es sich wohl darum, den Stickstoff in eine zur Assimilation brauchbarere Form zu bringen. Dies ist auch nach dem ganzen Verhalten der Bakterien anzunehmen: Die große Mehrzahl der Bakterien wächst in Nährlösung VII γ, kommt also mit dem Nitrat allein als Stickstoffquelle aus. Der Nitratreduktion fehlen die Merkmale der energetischen Prozesse. Bei diesen werden unter geringem Wachstum der Bakterien große Mengen Substanz umgesetzt. Dies ist aber hier durchaus nicht der Fall. B. tumescens und B. subtilis brauchen bei sehr starkem Wachstum zu ihren Lebensprozessen nicht einmal die Hälfte des vorhandenen Nitrats.

Wenn eine Ausnutzung dieses Stickstoffs zum Aufbau der Körpersubstanz durch unsere Bakterienspezies besser möglich wäre, sobald das Nitrat oder Nitrit zu Ammoniak reduziert wird, so wäre hieraus mit noch größerer Sicherheit zu schließen, daß die Nitratreduktion zum plastischen Teil des Stoffwechsels gehört.

Vergleichende Versuche darüber habe ich nicht angestellt, doch zeigt die Untersuchung im III. Teil, Kapitel 2, daß weinsaueres Ammoniak für alle drei Spezies ein guter Nährstoff ist. Es müsten noch vergleichende Untersuchungen über die Ausnutzung von Nitrat, Nitrit und Ammoniak durch die drei Spezies gemacht werden.

Zusammenfassend läßt sich also über die physiologische Bedeutung der Nitratreduktion sagen: Die Untersuchungen über die Beziehungen der Nitratreduktion zum Sauerstoff, sowie das ganze Verhalten der Bakterien machen es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei der Reduktion der Nitrate zu Nitrit und zu Ammoniak um einen Prozeß handelt, der den Bakterien zur Deckung ihres Stickstoffbedarfs dient, also zum plastischen Teil des Stoffwechsels gehört.

Daß bei der Reduktion nicht auch Energie gewonnen werden könnte, soll damit nicht gesagt sein; allerdings könnte es nur mit Hilfe der vorhandenen Kohlehydrate und organischen Säuren geschehen. **Kruse** hat für diese Prozesse Energiegleichungen aufgestellt; eine Wiedergabe derselben hat aber wenig Wert, da man nicht weiß, welches Spaltungsprodukt der Kohlehydrate die Reduktion veranlaßt. Es kann der Wasserstoff in statu nascendi sein, man kann sich aber auch nach **Stoklasa** und **Vítek** vorstellen, daß die Reduktion durch den beim Abbau der Kohlehydrate sich bildenden Alkohol herbeigeführt wird, nach der Gleichung:

$$C_2H_5OH + N_2O_3 = 2\ CO_2 + 2\ NH_3.$$

Zu vermuten ist, daß die Reduktion durch Wasserstoff herbeigeführt wird. Dies nehmen auch **Stoklasa** und **Vítek** an, wenn sie sagen: Die Reduktion der Salpetersäure zu salpetriger Säure erfolgt durch den in statu nascendi sich bildenden Wasserstoff. Dieser Wasserstoff selbst entsteht wieder bei Zersetzung der Kohlehydrate und organischen Säuren durch Atmungsenzyme. Die Ansicht von **Stoklasa** ist von anderen Forschern ausgesprochen worden, so von **Marpmann**[1], **Maassen** und **Loew**[2]. Sie alle sprechen dem aus den Kohlenstoffquellen gebildeten Wasserstoff die reduzierende Wirkung zu. Daß man berechtigt ist, sich die Reduktion in der genannten Weise vorzustellen, ergibt sich daraus, daß man auf rein chemischem Wege denselben Vorgang herbeiführen kann. Kaliumnitrat mit Glukose zusammengebracht, geht nach **Loew**[3] unter der katalytischen Wirkung von Platinmohr teilweise in Ammoniak über.

Von einer Ammoniakgärung zu sprechen, wie sie **Kruse**[4] nach den Ergebnissen von **Maassen**, dessen Bakterien häufig größere Ammoniakmengen anhäuften, für möglich hält, ist kein Grund vorhanden. Diese Ammoniakaufspeicherung, die auch in unserem Falle häufig vorhanden war, kann man sich doch auch auf die gewöhnliche Weise durch Reduktion erklären.

III. Teil.

Anhang.

1. Kapitel.

Mitteilungen über die Gasbildung bei B. asterosporus (A. M.) Migula.

Bacillus asterosporus ist die einzige von den im hiesigen Institut beschriebenen Spezies, die in Peptonlösungen Gas zu bilden vermag. Es war deshalb auch für sie am ehesten anzunehmen, daß sie Nitrate oder Nitrite unter Stickstoffentbindung zu reduzieren vermöge. Bei den darüber gemachten Untersuchungen bestätigte sich dies zwar nicht, es traten aber

---

[1] **Marpmann.** 1899. p. 67 ff.

[2] **Loew.** 1890. p. 677.

[3] **Loew.** 1890. p. 677.

[4] **Kruse.** 1910. p. 614.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

andere interessante Momente ein, welche eine eingehende Untersuchung wünschenswert machten.

Betreffs der Anordnung der Versuche sei vorausgeschickt, daß bei allen Untersuchungen Gärkölbchen benutzt wurden, wie sie im Praktikum p. 105 näher beschrieben sind. Die Nährlösungen wurden in die Kölbchen hineingefüllt und dann durch je 30 Minuten langes Erhitzen im Dampftopf an drei aufeinanderfolgenden Tagen keimfrei gemacht. Geimpft wurde jedesmal mit 2 Ösen voll gut schwärmenden Stäbchenmaterial, da die Sporen in manchen der benutzten Nährlösungen nicht keimen. Alle Untersuchungen sind bei 28° C ausgeführt.

Wie schon oben erwähnt, vermag B. asterosporus Nitrate und Nitrite nicht unter Stickstoffentwicklung zu zersetzen. Versuche, die mit Nährlösung VII γ und VIII β in Gärkölbchen angestellt wurden, verliefen ergebnislos. In keinem Falle war bei den öfters wiederholten Versuchen ein Anzeichen von Gasbildung vorhanden.

Einfluß von Nitraten und Nitriten auf die Gasbildung von B. asterosporus in Nährlösung I und V δ.

Zunächst seien die Ergebnisse mit Nährlösung I (1,0 Pepton, 1,0 Rohrzucker, 1,0 Fleischextrakt und 100,0 Proz. Wasser) angeführt. Für die Versuche wurden zu der Lösung 0,01 0,03, 0,06 und 0,1 Proz. Kaliumnitrat und 0,01, 0,06 und 0,1 Proz. Kaliumnitrit hinzugefügt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Menge des zugesetzten		Menge des gebildeten Gases in ccm in einer Zeit von				
Nitrats	Nitrits	3 Tagen	4 Tagen	7 Tagen	12 Tagen	16 Tagen
0,01 %	—	4 ccm		9 ccm		
0,03 %	—	1,5 ccm		10 ccm		
0,06 %	—	—	2 ccm	6 ccm		
0,1 %	—	—	—	—	—	—
—	0,01 %	2 ccm		2,5 ccm		
—	0,06 %	—	—	—	0,3 ccm	7,5 ccm
—	0,1 %	—	—	1 ccm		10 ccm

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, beginnt die Gasbildung, je nach der Menge des zugesetzten Nitrats oder Nitrits, verschieden schnell. Bei 0,01 Proz. Nitrat ist nach 3 Tagen 4 ccm, bei 0,03 Proz. 1,5 ccm und bei 0,1 Proz. überhaupt kein Gas gebildet. Ähnlich ist es bei Gegenwart von Nitriten. Es hängt dies damit zusammen, daß Gasbildung erst beginnt, wenn sämtliches Nitrat resp. Nitrit aus den Kulturen verschwunden ist. Ist es den Bakterien nicht möglich, alles Nitrat aufzuzehren, wie es bei 0,1 Proz. der Fall ist, so tritt auch keine typische Gasbildung ein. B. asterosporus zeigt also das merkwürdige Verhalten, daß er zunächst die Nitrate oder Nitrite aufzehrt, ehe die gewöhnliche Spaltung der vorhandenen Nährstoffe beginnt. Demgemäß müßte man annehmen, daß die Nitrate und Nitrite eine bessere Nährquelle für ihn sind, als Pepton. Dies ist aber nicht der Fall. Solange in Nährlösung I noch Nitrate oder Nitrite vorhanden sind, ist das Wachstum sehr schwach. Eine Trübung ist kaum wahrzunehmen. Sind die Nitrate aber aufgezehrt, so setzt sofort eine üppige Entwicklung ein, so daß schon nach 1 Tage die Nährlösung von schleimigen Bakterienmassen ganz getrübt ist.

Eine Erklärung für dieses sonderbare Verhalten von B. asterosporus ist bis jetzt nicht zu geben.

In Nährlösung V α (3,0 Proz. Asparagin, 1,0 Proz. Rohrzucker, 100,0 Proz. Nährlösung), in der B. asterosporus ebenfalls Gas, wenn auch lange nicht in dem Maße, wie in Nährlösung I zu bilden vermag, war von einer derartigen Einwirkung von Nitraten und Nitriten nichts zu merken. Die Nitrate und Nitrite hemmten auch hier das Wachstum, beschleunigten aber die Gasbildung. In einem Falle waren hier nach 3 Tagen 6 ccm, nach 8 Tagen 8,5 ccm Gas gebildet, in einem anderen nach 2 Tagen 3 ccm, während in der reinen Nährlösung ohne Nitratzusatz die Gasbildung viel geringer ist (siehe später). Nitrat und Nitrit ließ sich während der ganzen Untersuchungsdauer in großen Mengen nachweisen.

Aus welchen Stoffen bildet B. asterosporus das Gas.

B. asterosporus war bisher immer nur in Nährlösung I auf Gasbildung hin untersucht worden. Da diese Pepton, Fleischextrakt und Rohrzucker enthält, so ist es nicht ersichtlich, aus welchen Stoffen das Gas stammt. Wegen seiner Zusammensetzung, nach den im Praktikum gemachten Angaben besteht es aus 70—80 Proz. Wasserstoff und 20—30 Proz. Kohlendioxyd, war allerdings anzunehmen, daß es sich aus dem Rohrzucker bildet, da die aus Kohlehydraten gebildeten Gase in der Regel nur aus diesen zwei Stoffen bestehen (vergl. Kruse 1910). Um die Frage zu entscheiden, wurde der Bacillus in eine Nährlösung eingeimpft, die die Zusammensetzung von Lösung I hatte, aus der aber der Zucker weggelassen war. Gasbildung trat unter diesen Umständen nicht ein, obgleich der Versuch sich auf eine Dauer von 17 Tagen erstreckte. Es ist also wahrscheinlich, daß das Kohlehydrat das Gas liefert. Es fragte sich nun weiter, ob auch andere Stoffe wie Alkohole und Salze organischer Säuren den Zucker vertreten können, und ob das Pepton durch Asparagin sich ersetzen läßt. Zu dem ersten Versuche wurde in Nährlösung I der Rohrzucker durch die gleiche Menge (1 Proz.) Glyzerin, resp. Natriumtartrat ersetzt, zu dem zweiten Nährlösung V α benutzt. (3,0 Proz. Asparagin, 1,0 Proz. Rohrzucker und 100,0 Proz. Nährlösung.) Die Resultate habe ich auch hier zur Übersicht in einer Tabelle zusammengestellt und zum Vergleich die mit Nährlösung I unter gleichen Bedingungen erzielten Ergebnisse hinzugefügt.

Art der Nährlösung	Intensität des Wachstums	Menge des gebildeten Gases in ccm nach einer Zeit von			
		1 Tag	3 Tagen	7 Tagen	12 Tagen
Nährlösung I	sehr stark	5	8		
Nährlösung I statt Zucker 1,0 Glyzerin	sehr stark	2½	6		
Nährlösung I statt Zucker 1,0 Natriumtartrat	schwach	Keine Gasbildung vorhanden. Auch nach 4-wöchentlichem Wachstum nicht.			
Nährlösung Vα, 1. Kultur	stark	—	—	4	
2. Kultur	schwach	—	—	2½	2½
3. Kultur	schwach	—	—	—	1

Hiernach kann also auch Glyzerin unter Gasbildung von B. asterosporus zersetzt werden. Die Zersetzung erfolgt aber hier bedeutend langsamer, obgleich hinsichtlich des Wachstums ein Unterschied mit Nährlösung I nicht zu bemerken ist.

Nicht geeignet zur Gasbildung scheinen die Salze der organischen Säuren zu sein, dagegen kann Asparagin als Ersatz für Pepton dienen. Die sehr ungleichen Resultate, die mit der Asparaginnährlösung erzielt wurden, sind auf das Wachstum zurückzuführen, das ohne erkennbare Ursachen große Schwankungen zeigte. Jedenfalls geht aber aus den Versuchen hervor, daß B. asterosporus imstande ist, aus Kohlehydraten bei Gegenwart von Asparagin Gas zu bilden, daß also die Gasbildung nicht an die Gegenwart von Pepton gebunden ist.

2. Kapitel.

Vermögen die Bakterien Ammoniak zu Nitrit und zu Nitrat zu oxydieren?

Zur Untersuchung auf diese Frage wurden die Bakterien in verschieden zusammengesetzten Nährlösungen gezüchtet. Als Ammoniaksalze wurden weinsaures Ammonium und auch Chlorammonium gereicht. Als Kohlehydrate fanden sowohl Rohrzucker als auch Dextrose und auch Mannit Verwendung. Endlich kam auch eine Nährlösung in Anwendung, die nur weinsaures Ammonium ohne Zusatz eines Kohlehydrates enthielt. Die Zusammensetzung der benutzten Nährlösungen war die folgende:

N. L. VI α	weinsaures Ammonium	0,1	Dextrose	1,0	M. L. 100,0
N. L. VI β	„ „	0,1	Rohrzucker	1,0	M. L. 100,0
N. L. VI δ	„ „	0,1	Mannit	1,0	M. L. 100,0
N. L. VI ε	„ „	1,0			M. L. 100,0
N. L. XV	Chlorammonium	1,0	Dextrose	1,0	M. L. 100,0

Als Kulturgefäße wurden Reagenzröhrchen von 15 cm Länge und 1,5 cm Weite, sowie auch von 12 cm Länge und 1,0 cm Weite benutzt. Die Nährlösungen wurden in die Röhrchen hineingefüllt, in der üblichen Weise sterilisiert, geimpft und dann bei 28° resp. 60° in den Brutschrank gestellt. Geimpft wurde immer mit Stäbchenmaterial von einer kräftig wachsenden Kultur der betreffenden Spezies. Untersucht wurden die Kulturen nach 3 und 10 Tagen sowie nach 3 und 4 Wochen auf Bildung von Nitrit und Nitrat. Als Reagens, um diese nachzuweisen, diente Diphenylamin-Schwefelsäure, wobei, falls die Reaktion positiv ausfiel, noch gesondert auf Nitrit zu prüfen war, da das Reagens ja sowohl Nitrat wie Nitrit anzeigt.

Eine Umwandlung von Ammoniak in Nitrit und Nitrat konnte jedoch in keinem Falle beobachtet werden. Die Reaktion fiel immer negativ aus. Demnach kommt den 28 Spezies die Fähigkeit, Ammoniak zu Nitrit und zu Nitrat oder zu einem dieser beiden zu oxydieren, unter den gegebenen Verhältnissen nicht zu.

In den verschiedenen Nährlösungen entwickelten sich die Bakterien sehr verschieden stark. Am besten war das Wachstum in allen Fällen in den Dextrose resp. Rohrzucker enthaltenden Nährlösungen. Da die Art des Wachstums in den verschiedenen Nährlösungen als speziesdiagnostisches Merkmal zu verwerten ist, so lasse ich nachstehend eine Intensitätstabelle des Wachstums in den verschiedenen Nährlösungen folgen.

Die römischen Ziffern der Tabelle beziehen sich auf die Nährlösungen, während die Intensitätszahlen 0—4 den Grad der Entwicklung für jede

Spezies in den verschiedenen Nährlösungen vergleichend angeben. Dabei bedeutet 0 = keine Entwicklung, 1 = schwach, kaum vorhandenes Wachstum, 2 = Entwicklung deutlich, Lösung merklich getrübt, 3 = starke Entwicklung, Lösung stark getrübt, 4 = sehr starke Entwicklung, Lösung meist dick und undurchsichtig.

Name des Bacillus	Intensität des Wachstums in den verschiedenen Nährlösungen 4 = sehr stark, 3 = stark, 2 = schwach, 1 = sehr schwach (vergl. Gottheil p. 10)					Bemerkungen
	VI *α*	VI *β*	VI *δ*	VI *ε*	XV	
1. B. alvei	4	2	2	0	3	Die angestrichenen sind von mir untersucht.
2. B. asterosporus	4	4	3	0	2	
3. B. calidus	2/	4/	0/	0/	2/	
4. B. carotarum	3	4	3—4	3	2	
5. B. cohaerens	4—3	2	4—3	4—3	3	
6. B. cylindricus	3/	3/	3/	3/	2/	
7. B. Ellenbachensis	1	4	0	1	0—1	
8. B. fusiformis	4	2	0—1	0	0	
9. B. graveolens	4	2	1	0	2	
10. B. lactis	2	3	1	0—1	1	
11. B. lacticola	4	4	0—1	0—1	3	
12. B. luteus	4/	4/	2/	1/	3/	
13. B. megathaerium	4	4	3—4	2	2—3	
14. B. mycoides	2	4	0	0	2	
15. B. oxalaticus	4/	3/	4/	2/	3/	
16. B. parvus	4	4—3	3	0	3	
17. B. Petasites	4	3	3	0	3	
18. B. pumilus	3	4	3	2	3	
19. B. robur	4	3	1	1	1—2	
20. B. robustus	2/	4/	1/	3/	1/	
21. B. ruminatus	4	3	3	0	2	
22. B. simplex	4	3—4	4	1—2	3	
23. B. silvaticus	4	3	4	0	3	
24. B. sphaericus	2	4	4	3—4	1	
25. B. subtilis	4	3	3	0—1	3	
26. B. teres	4	3	2	1	2—3	
27. B. tostus	4/	2/	2/	4/	1/	
28. B. tumescens	4	3—4	3	0	3	

3. Kapitel.

Vermögen die Bakterien aus Pepton Ammoniak, Nitrit und Nitrat zu bilden?

Zu den Untersuchungen auf diese Frage wurde eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung benutzt: Pepton 1,0 Proz., Dextrose 1,0 Proz., M.-Nährlösung 100,0 Proz. Als Kulturgefäße dienten die schon öfters genannten Erlenmeyerkölbchen. Untersucht wurde nach einer Entwicklungsdauer von 4 Wochen. Bei den Bakterien, bei denen nach dieser Zeit kein Ammoniak nachzuweisen war, wurde auch nach 8 Tagen untersucht.

Nitrit und Nitratbildung aus Pepton ließ sich in keinem Falle nachweisen. Unsern Bakterien kommt also diese Fähigkeit unter den gegebenen Bedingungen nicht zu. Als Reagens diente hier ebenfalls Diphenylamin.

Die Ergebnisse der Untersuchung auf Ammoniakbildung sind in folgender Tabelle zusammengestellt, wobei auch zugleich die Reaktion der Nährlösung nach vierwöchentlicher Entwicklungsdauer, sowie die Intensität des Wachstums bemerkt ist. Für die hierfür gegebenen Zahlen gelten die im Abschnitt über das Wachstum in Ammoniaklösungen gemachten Angaben.

Namen des Bacillus	Intensität des Wachstums nach		Reaktion der Nährlösung nach einem Wachstum von 4 Wochen	Ammoniakbildung nach		Bemerkungen
	8 Tg.	4 Wch.		8 Tagen	4 Wochen	
1 B. alvei . . .		3	alkalisch		stark	
2 B. asterosporus		4	sauer	nicht vorh.[1]	nicht vorh.	[1] Es entsteht mit Neßlers Reagens ein gelber, bald grün-schw. werdender Niederschlag.
3 B. calidus. . .		1	sauer	—	zieml. stark	
4 B. carotarum .		4	schw. alkal.		stark	
5 B. cohaerens .		3	neutral		mittelstark	
6 B. cylindricus .		2	sauer	sehr stark	stark	
7 B. Ellenbachensis		3	schw. sauer		mittelstark	
8 B. fusiformis .		3	alkalisch		sehr stark	
9 B. graveolens .		3	neutral	nicht vorh.	nicht vorh.	
10 B. lactis . . .		4	sauer		mittelstark	
11 B. lacticola . .		4	sauer		stark	
12 B. luteus . . .		4	sauer	stark	mittelstark	
13 B. megathaerium		3	sauer		mittelstark	
14 B. mycoides. .		2	schw. sauer		schwach	
15 B. oxalaticus .		4	sauer		mittelstark	
16 B. parvus . .		2	schw. alkal.		stark	
17 B. Petasites .		2	schw. sauer	nicht vorh.	nicht vorh.	
18 B. pumilus . .		3	sauer	stark	do.	
19 B. robur . . .		4	do.		mittelstark	
20 B. robustus . .		4	sauer	nicht vorh.	stark	
21 B. ruminatus .		2	schw. alkal.		mittelstark	
22 B. silvaticus .		3	stark sauer		do.	
23 B. simplex . .		3	sauer	stark	nicht vorh.	
24 B. sphaericus .		4	neutral		mittelstark	
25 B. subtilis . .		4	schw. alkal.		sehr stark	
26 B. teres . . .		3	schw. sauer		mittelstark	
27 B. tostus . . .		4	sauer	stark	stark	
28 B. tumescens .		3	schw. sauer	schwach	nicht vorh.	

Literatur.

1. Autenrieth, W. u. Koenigsberger, Über ein neues Kolorimeter und dessen Verwendung zur Bestimmung von Blutfarbstoff, Eisen, Indikan und Kreatinin. (München. med. Wochenschr. 57. 1910. p. 998).
2. Bach, A., Sur le mécanisme chimique de la réduction des azotates et de la formation de matières azotées quartenaires dans les plantes. (Compt. rend. T. 122. 1896. p. 1499.)
3. Baur, A., Über zwei denitrifizierende Bakterien aus der Ostsee. (Wissenschaftl. Meeresunters. N. F. Bd. 6. 1902. p. 11.)
   Beijerink, M. W., und van Delden A., Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. 1902. p. 42.)
4. Blau, Oskar, Über die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und Sporenbildung usw. [Dissert.] Marburg 1905. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. p.407.)
5. Boussingault, Über die Menge des im Harn enthaltenen Ammoniaks. (Journ. f. prakt. Chem. Bd. 51. 1850. p. 281.)
6. Bredemann, Gustav, Bacillus amylobacter. [Dissert.] Marburg 1909. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 23.)
7. Busch, M., Gravimetrische Bestimmung der Salpetersäure. (Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Jahrg. 38. 1. 1905. p. 861.)
8. —, Oxydation der salpetrigen Säure durch Wasserstoffsuperoxyd. (Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Jahrg. 39. 2. 1906. p. 1401.)
9. Chester, Fred., A review of the Bacillus subtilis group of bacteria. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 737.)

10. **Cingolani, M.**, Ricerche intorno al prozesso della denitrificazione. (Staz. sperim. agr. Vol. 41. 1908. p. 521—538. Refer. im Centralbl. f. Bakt. Akt. II. Bd. 23. 1909. p. 238.)
11. **Czapek**, Biochemie der Pflanzen. 1904.
12. **Dieudonné**, A., Beiträge zur Nitritbildung der Bakterien. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 11. 1895. p. 508.)
13. **Düggeli, Max**, Die Bakterienflora gesunder Samen und der daraus gezogenen jungen Keimpflänzchen. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 61 u. 198.)
14. **Erdmann**, A., Über Trinkwasserprüfung mit Amido-naphtol-K-säure. (Zeitschr. f. angew. Chem. 1900. p. 33.)
15. **Fichtenholz**, A., Sur une mode d'action du Bacillus subtilis dans les phénomènes de dénitrification. (Compt. rend. T. 128. 1899. p. 422.)
16. **Flügge**, C., Die Mikroorganismen. Bd. 2. Leipzig 1896.
17. **Folin, Otto**, Eine neue Methode zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn und anderen tierischen Flüssigkeiten. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 37. 1902—1903. p. 161.)
18. **Frankland**, G. u. P., Über einige typische Mikroorganismen im Wasser und im Boden. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. 6. 1899. p. 373.)
19. **Franzen, Hartwig**, Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen. I. Mitteilung: Quantitative Bestimmungen zur Salpetervergärung. Von H. Franzen u. E. Löhmann. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 63. 1909. p. 52.)
20. **Franzen, H. u. Löhmann, E.**, Über die Verwendung des Nitron zur Bestimmung der Salpetersäure in Flüssigkeiten, die viel organische Substanz enthalten. (Journ. f. prakt. Chem. N. F. Bd. 79. 1909. p. 330.)
21. **Fred, Edwin Broun**, Eine physiologische Studie über die nitratreduzierenden Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 421.)
22. **Garbowski, Ludwig**, Über Abschwächung und Variabilität bei Bacillus luteus (Smith et Baker) und Bac. tumescens (Zopf). [Dissert.] Marburg 1907. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 19.)
23. **Gayon et Dupetit**, Sur la transformation des nitrates en nitrites. (Compt. rend. T. 95. 1882. p. 1365.)
24. **Gerlach u. Vogel**, Ammoniakassimilierende Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 612.)
25. **Gottheil, Otto**, Botanische Beschreibung einer Anzahl sporenbildender Bakterien. [Dissert.] Marburg 1901. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901.)
26. **Gran**, G., Studien über Meeresbakterien: I. Reduktion von Nitraten und Nitriten. (Bergens Museums Aarbog. 1901. No. 10.)
27. **Grafe, Erich**, Methodisches zur Ammoniakbestimmung in tierischen Geweben. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 48. p. 300.)
28. **Gredig, Eugen**, Beiträge zur Nitrifikation und Nitratzersetzung im Neckarwasser. [Dissert.] Heidelberg 1906.
29. **Grieß**, P., Über Diamidobenzoësäure. (Annalen d. Chem. u. Pharm. Bd. 154. 1870.)
30. **Günther**, Einführung in das Studium der Bakteriologie. 1906.
31. **Heraeus**, W., Über das Verhalten der Bakterien im Brunnenwasser, sowie über oxydierende und reduzierende Eigenschaften der Bakterien. (Zeitschr. f. Hyg. Bd. I. 1886. p. 193.)
32. **Kolle u. Wassermann**, Handb. d. pathog. Mikroorg. Bd. I. 1903.
33. **Kruse**, Allgemeine Mikrobiologie. 1910. p. 606.
34. **Krüger, M. u. Reich, O.**, Zur Methodik der Bestimmung des Ammoniaks im Harn. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39. 1903. p. 165.)
35. **Lafar**, Handbuch der techn. Mykologie. Bd. 3.
36. **Laurent**, E., Recherches sur la valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelques autres plantes.(Ann. de l'Instit. Pasteur. T. 3. 1889. p. 371.)
37. —, Expériences sur la reduction des nitrates par les végétaux. (Ann. de l'Instit. Pasteur. T. 4. 1890. p. 722.)
38. **Lehmann u. Neumann**, Atlas u. Grundriß d. Bakteriologie. Bd. 2. 1912.
39. **Leone**, Über die Reduktion der Nitrate durch Mikroorganismen; Referat von Foerster. Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 23. 1890. p. 179.)
40. **Loew**, O., Katalytische Bildung von Ammoniak aus Nitraten. (Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 23. 1890. p. 677.)
41. **Löhnis**, F., Landwirtschaftliche Bakteriologie. 1910. p. 623.
42. **Lunkewicz**, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 16. p. 945 (1896).

43. Maassen, A., Die Zersetzung der Nitrate und Nitrite durch die Bakterien. (Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt. Bd. 18. 1902. p. 21—77.)
44. Marchal, E., Sur la production de l'ammoniaque dans le sol par les microbes. (Bullet. de l'Acad. roy. de Belgique. Sér. III. T. 25. 1893. p. 766.)
45. Marpmann, G., Über Denitrifikationsvorgänge in der Natur. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 5. 1899. p. 67.)
46. Mennike, G., Zum Nachweis von salpetriger Säure in Wasser mit Amidonaphtol-K-Säure nach H. Erdmann. (Zeitschr. f. angew. Chem. 1900. p. 235.)
47. —, Kritische Studien über die wichtigsten Reagentien zum Nachweis der salpetrigen Säure im Wasser. (Zeitschr. f. angew. Chem. 1900. p. 711.)
48. Meyer, Arthur, Studien über Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Bakterien. (Flora. Bd. 84. 1897. Erg. Bd., p. 185.)
49. —, Über Geiseln, Reservestoffe, Kerne und Sporenbildung der Bakterien. (Flora. Bd. 86. 1899. p. 488.)
50. —, Praktikum der botanischen Bakterienkunde, Jena 1903.
51. —, Die Zelle der Bakterien. Jena 1912.
52. Migula, W., System der Bakterien. Bd. 2. Jena 1900.
53. Molisch, H., Über einige Beziehungen zwischen anorganischen Stickstoffsalzen und der Pflanze. (Sitzungsber. d. Wien. Akad. d. Wiss. Math. naturw. Kl. Bd. 95. 1887. p. 221.)
54. Neide, Ernst, Botanische Beschreibung einiger sporenbildender Bakterien. [Dissert.] Marburg 1904. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12.)
55. Ostwald, W., Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physikochemischer Messungen. 1910.
56. Pelz, Über Nitritbildung durch Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Orig.-Abt. I. Bd. 57. 1911. p. 1.)
57. Pfeffer, Pflanzenphysiologie. Bd. 1. 1897. p. 557.)
58. Riegler, E., Eine empfindliche einfache Reaktion auf salpetrige Säure. (Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 35. 1896. p. 677.)
59. —, Über eine sehr empfindliche Reaktion auf Nitrite, wie auch über die quantitative Bestimmung derselben auf kolorimetrischem Wege. (Zeitschr. f. analyt. Chem. Bd. 36. 1897. p. 377.)
60. Ritter, H., Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquellen für Schimmelpilze. (Ber. d. deutsch. bot. Gesellsch. Bd. 27. 1909. p. 582.)
61. Rubner, Reduktionswirkungen bei Bakterien. Arch. f. Hyg. Bd. 16. 1893. p. 62.)
62. Salzmann, K., Chemisch-physiologische Untersuchungen über die Lebensdauer zweier denitrifizierender Bakterien und der Streptothrix odorifera [Dissert.] Königsberg 1902.
63. Severin, Ein Beitrag zur Anilitfrage. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 9. 1902. p. 713 u. 746.)
64. Schittenhelm, A., Zur Methodik der Ammoniakbestimmung. (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 39. 1903. p. 73.)
65. Schirokikh, Über einen Salpeter zerstörenden Pilz. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 2. 1896. p. 204.)
66. Schmidt, E., Ausführliches Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. Bd. I. 1906/1907.
67. Stoklasa, Jul., Biologische Studien über Anilit. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 4. 1898. p. 285.)
68. —, Assimilieren die Anilitbakterien den Luftstickstoff? (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 5. 1899. p. 350.)
69. Stoklasa, Jul., und Vítek, E., Beiträge zur Erkenntnis des Einflusses verschiedener Kohlehydrate und organischer Säuren auf die Metamorphose des Nitrates durch Bakterien. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14 1905. p. 102—183.)
70. Takahaschi, T., Können salpetersaure Salze für anaërobe Bakterien Sauerstoff liefern? (Refer. in Kochs Jahresber. Bd. 16. 1905. p. 377.)
71. Tillmann, J. u. Suthoff, W., Ein einfaches Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung von Salpetersäure und salpetriger Säure in Wasser. (Zeitschr. f. analyt. Chem. 1911. H. 8.)
72. Treadwell, F. P., Lehrbuch der analyt. Chemie. Bd. 2. 1908 u. 1911.
73. Vahle, Karl, Vergleichende Untersuchung über die Myxobakteriazeen und Bakteriazeen sowie die Rhodobakteriazeen und Spirillaceen. [Dissert.] Marburg 1909.
74. Viehöver, A., [Dissertation]. Marburg 1913.

75. **Warington, R.**, The chemical Actions of some Microorganisms. (Journ. of the chem. Soc. (Transact.) Vol. 53. 1888. p. 727.)
76. **Weißenberg, Hugo**, Studien über Denitrifikation. (Arch. f. Hyg. Bd. 30. 1897. p. 274.)
77. **Wolff, Kurt**, Denitrifikation und Gärung. (Hyg. Rundsch. Jahrg. 9. 1899. p. 538.)
78. **Wund, Martin**, Feststellung der Kardinalpunkte der Sauerstoffkonzentration usw. [Dissert.]. Marburg 1905.

Nachdruck verboten.

Antagonism between Anions as affecting Soil Bacteria.

II. Nitrification.

By **C. B. Lipman** and **P. S. Burgess**,
Laboratory of Soil Chemistry and Bacteriology, University of California.

With 6 Curves in the texte.

One of the most serious problems confronting the student of agriculture in arid lands is connected with the control and reclamation of the so-called „alkali“ soils. The latter form a very considerable part of the total area of agricultural lands in arid countries and may be in greater or lesser degree unfit for crops owing to the presence in them of different kinds and amounts of salts, usually the sodium salts of hydrochloric, sulfuric and carbonic acids. Such alkali soils are however profusely fertile if the excess of soluble salts is, in one way or another, rendered harmless to plants. The only permanent method of reclamation thus far proposed is underdrainage by means of tile drains and flooding to dissolve and carry off a considerable portion, if not all, of the alkali. This method of reclamation is rather expensive and under the widely varying conditions in California for example may involve an expenditure of $ 25. to $ 45. per acre. Other methods of rendering "alkali" in soils inoccuous therefore would be very welcome, as would also methods which would assist and lower the cost of the method above described.

In view of the foregoing, it has appeared to one of us that we might use as a basis the principles gleaned from researches in pure science, to establish, if feasible, a new method or new methods for such reclamation work. The principles which were thus to be studied in their practical phases were those of the antagonism between salts, and of physiologically balanced solutions. The validity of these principles for the plant world has been demonstrated by plant physiologists, notably by Osterhout, and they in turn have based their work on Loebs conception of physiologically balanced solutions which resulted from the celebrated series of experiments carried out by that investigator. It is unnecessary here to go into a review of the literature of this subject for one of us has already discussed it in earlier papers published in this journal[1]). To explain and introduce the following work however it must be said that the current conception with respect to antagonism between salts as based on Loebs experiments has disregarded until now the rôle of the anion or ascribed to it but little significance. Starting over five years ago with the idea merely of pointing out the relation of Loebs conception to the bacterial world which until then had not thus been studied, C. B. Lipman conceived the idea of broadening the investigations so as to render the results obtained from them of some significance for the management of alkali soils. But since the soluble salts of such soils are largely those of different anions but with the same kation it was clear that the assumption that the anions was of no significance in this connection could no longer be allowed to stand without a thorough test. It was argued that if a sufficiently marked antagonism between the anions of alkali salts was found to exist, that fact would offer some hope for a chemical method of alkali control more promising than one based merely on the idea of antagonism between ions as confined to kations.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 58; Bd. 33. p. 305; Bd. 36. p. 382.

One of us therefore inaugurated experiments on the antagonism between anions as affecting plants and soil bacteria the latter based on the fact that soil bacteria are admitteldy one of the important factors in soil fertility. The experiments were all carried out in the natural soil medium, it having been demonstrated to our satisfaction that results obtained in solution cultures were not necessarily valid for soils, except in principle, and not always then. It may be added here that until our work began researches on the subject of antagonism between salts as affecting plants had been carried out in solution cultures and the same holds true today. The discussion of results obtained with plants in our experiments is reserved for other publications. Some results dealing with the relation of the antagonism between anions to ammonification in soils have been published in this journal[1]), and we propose to present in this paper results obtained in nitrification investigations which we consider even more striking than the foregoing. Similar work is also in progress on symbiotic and non-symbiotic nitrogen fixation the results of which will appear later.

The Experiments and their Results.

The experiments were in general arranged like those described in the paper last cited. Portions of 100 gms of a sandy soil from Anaheim, Cal., were placed in tumblers mixed with one gram of dried blood and the necessary amounts of salts, as indicated in the tables, and the optimum amount of water added. The soils were then stirred with a sterile spatula, the tumblers covered with a Petri dish cover and incubated at about 30° C. for one month. At the end of the incubation period the soils were dried and analyzed for nitrates by the aluminum reduction method described elsewhere[2]) by Mr. P. S. Burgess. Sterile and untreated check cultures accompanied all series. The latter were arranged further so as to give reciprocal salt treatments and allow of an opportunity to test the toxic concentrations of each of the three salts tested with varying concentrations of all the other salts thus making six series in all.

Series I. Na_2SO_4 versus NaCl.

In this series in which the cultures were prepared as above described, the salt used at a toxic concentration throughout was NaCl at a concentration of .2 per cent. Varying quantities of Na_2SO_4 were added as shown in Table I in which also other explanatory data are given. Columns marked 1 and 2 show determinations for nitrates in duplicate, for similarly treated cultures after one months incubation.

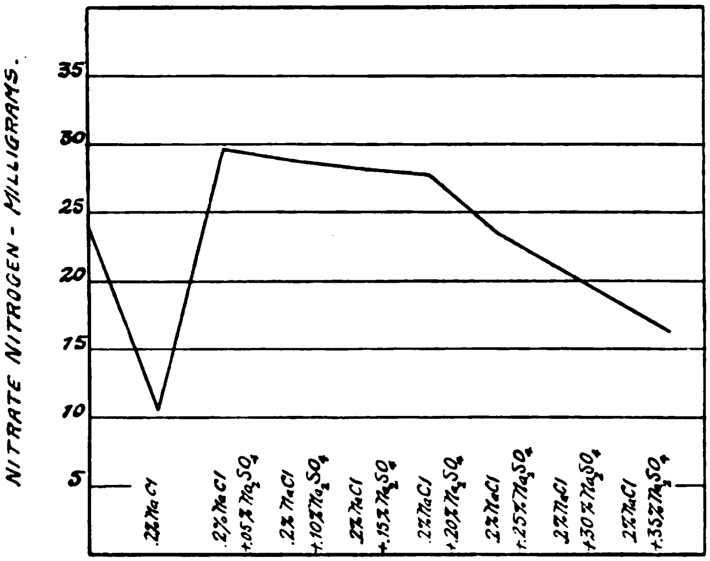
---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36. p. 382.

[2]) Univ. of Cal. Publ. Ser. in Agric. Scienc. Vol. 1. No. 4.

Table I.
Na_2SO_4 versus NaCl.

Culture No.	% NaCl in dry soil	% Na_2SO_4 added to dry soil	N. as nitrate produced mgs. 1	N. as nitrate produced mgs. 2	Average N as nitrate produced mgs.
1	0	0	23.52	23.24	23.38
2	.20	0	10.08	10.92	10.50
3	.20	.05	29.96	29.40	29.68
4	.20	.10	28.56	29.26	28.91
5	.20	.15	28.00	28.56	28.28
6	.20	.20	28.00	27.58	27.79
7	.20	.25	23.80	22.96	23.38
8	.20	.30	20.44	20.72	20.58
9	.20	.35	17.08	18.48	17.78



Percentages of Salts in Cultures.
Fig. 1.

The data in Table I as well as the curve based on them given in Fig. 1 constitute one of the most marked evidences of the existence of a genuine antagonism between ions in general and anions in particular that it has ever been our good fortune to obtain in investigations of this kind. No explanation of the data can really serve to bring out as lucidly as do the analytical data and the curve in Fig. 1, the striking interaction of the SO_4- and the -Cl ions which must have obtained in the cultures to permit of the formation of nitrates by the nitrifying bacteria as there indicated. It may serve to emphasize the data however to discuss several of their important features.

The most favorable combination of salts for the activation of the nitrifying flora in question is that of .2 per cent NaCl plus .05 per cent Na_2SO_4 in the presence of which the amount of nitrates produced is one quarter again as large as that yielded by the same flora under similar conditions in the absence of alkali salts, except in traces which are naturally present in the soil. Moreover, increased nitrate production continues with the addition of increasingly larger amounts of Na_2SO_4 to the .2 per cent NaCl until .25 per cent Na_2SO_4 are added even though it begins to be slightly smaller with each addition of the last named salt in excess of .05 per cent. This continual decrease is however slight and even with the addition of .25 per cent Na_2SO_4, thus making the total alkali content of the soil equal to .45 per cent, as much nitrate is produced as in the normal "alkali free" soil. Beyond the concentration of .25 per cent Na_2SO_4 plus .2 per cent NaCl further additions of the first mentioned salt make the soil medium poorer than the normal for nitrate production as indicated in the data above given. It is eminently worthy of note here, however, despite the foregoing statement, that the increase of the total salt content to .55 per cent by adding .35 per cent Na_2SO_4 to .2 per cent NaCl still fails to render the soil anywhere near so poor a medium for the nitrifying flora studied as does the addition of .2 per cent NaCl alone to the normal soil. Unfortunately, higher concentrations of Na_2SO_4 than .35 per cent of the dry weight of the soil were not employed in this series and it is therefore impossible to say by how much the total alkali content of the soil might be augmented in the manner above described and still allow the bacteria to produce as much nitrate as they yield in the soil containing only .2 per cent of alkali all of which is NaCl.

Comparing these data with those secured by one of us[1]) in a similar antagonism series between NaCl and Na_2SO_4 on the ammonifying flora of the same soil, we find that the nitrification data exemplify the antagonism between the $-SO_4$ and the -Cl ions much more strikingly than those on ammonification. Besides, the best combination of NaCl and Na_2SO_4 for ammonification is .2 per cent of the former and .3 per cent of the latter whereas in the case of the nitrifying flora the concentration of Na_2SO_4 which must be added to .2 per cent NaCl to yield the best results is only .05 per cent. While the latter addition of salt increases the production of nitrate by more than 25 per cent of the amount yielded by the "alkali free" soil, the addition of .3 per cent Na_2SO_4 to .2 per cent NaCl in the case of ammonification only increases the yield of ammonia by less than 25 per cent of the amount produced when the .2 per cent NaCl alone is present which is however far below the amount of ammonia produced in the "normal" soil. The curve in Fig. 1 of the present paper is far more marked and convincing proof of the antagonism which exists between NaCl and Na_2SO_4 than that in Fig. 1 of the paper above cited.

Series II. **NaCl versus Na_2SO_4.**

In these investigations it was decided to make the data more complete than in those carried out on ammonification to which we referred above. Therefore, reciprocal series were run in which each of the two salts used was started and uniformily employed at a concentration at which it had been proven toxic in previous work[2]). Therefore in Series I a toxic concentration of Na_2SO_4 for nitrifiers namely .35 per cent was used throughout and varying amounts of NaCl were added to the cultures as indicated in Table II. Series I and II therefore give an excellent comparison between the effects of the addition of Na_2SO_4 to a constant toxic concentration of NaCl and those following from the addition of varying quantities of NaCl to a constant and toxic concentration of Na_2SO_4. The results obtained in

---

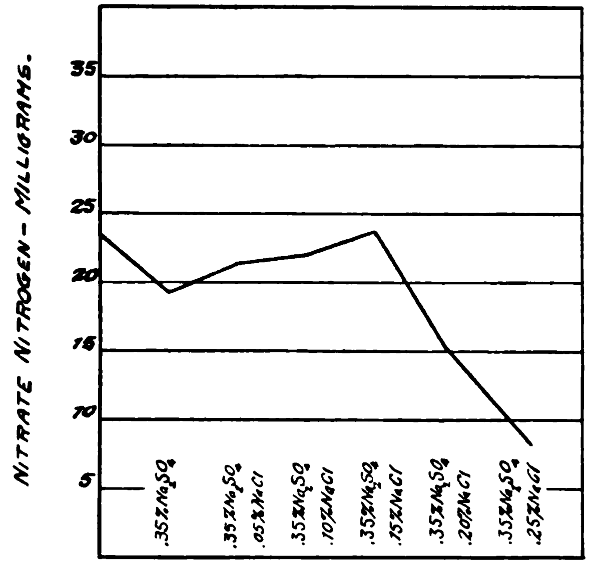
[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 35. p. 382.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 33. p. 305.

Series II with other necessary explanatory data follow in Table II and Fig. 2 gives a curve to illustrate the last mentioned data graphically.

Table II.
NaCl versus Na_2SO_4.

Culture No.	% Na_2SO_4 in dry soil	% NaCl added to dry soil	N. as nitrate produced mgs. 1	N. as nitrate produced mgs. 2	Average N. as nitrate produced mgs.
1	0	0	23.52	23.24	23.38
2	.35	0	19.04	19.88	19.46
3	.35	.05	20.72	21.56	21.14
4	.35	.10	21.56	22.40	21.98
5	.35	.15	23.52	23.80	23.66
6	.35	.20	18.48	12.60	15.54
7	.35	.25	9.80	lost	9.80



Percentages of Salts in Cultures.
Fig. 2.

It appears from the data in Table II that when Na_2SO_4 is used at the toxic point throughout and NaCl is used to antagonize it we obtain similar results to those obtained in the reciprocal Series I. It is also interesting to note from the point of view of the validity and reliability of the results that in the two different series the combination of .35 per cent Na_2SO_4 plus .2 per cent NaCl gives virtually the same results especially if one of the determinations No. 2 for the salt combination named in Series II be left out of consideration. The three other determinations agree very well.

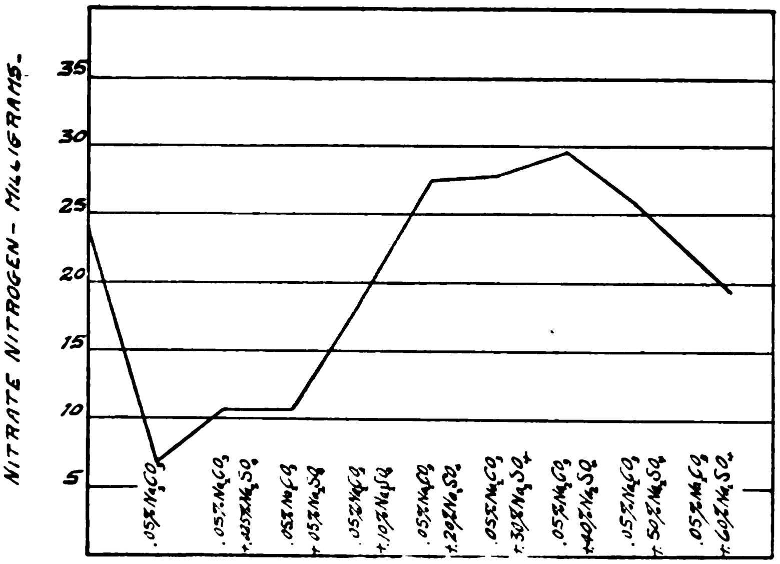
We find also from these data that considerable quantities of NaCl must be used to allow of a maximum of antagonism between the two salts in Series II, whereas small quantities of Na_2SO_4 in Series I very efficiently antagonize large quantities of NaCl. In other words, we obtain an immediate and marked antagonism in Series I by adding .05 per cent Na_2SO_4 to .2 per cent NaCl and larger additions of the first named salt do not make for more marked antagonism and may even lower the yield. In Series II on the other hand the addition of NaCl to Na_2SO_4 at the latter's toxic concentration only partially antagonizes the Na_2SO_4 and the antagonism becomes more marked as more and more NaCl at intervals of .05 per cent is added and until a concentration of .15 per cent NaCl is reached, when the maximum of antagonism between the two salts is obtained. It should also be added here that this latter maximum of antagonism allows of the production of 23.66 mgs. of nitrate nitrogen, in the presence of a total alkali content of .5 per cent, or slightly more than that produced in the normal soil to which no salt was added. In other words, we have so balanced Na_2SO_4 and NaCl in this culture that nitrification goes on as if no alkali were present and, that, despite the fact that NaCl at the concentration employed here, when present alone, decreases the normal nitrifying power of the soil used by about 50 per cent and Na_2SO_4 alone at the concentration here employed decreases it by about 15 per cent.

Beyond the concentrations just discussed, for example when .2 per cent NaCl or more are added to .35 per cent Na_2SO_4 the medium rapidly and markedly becomes more toxic than the normal soil. It must be noted, nevertheless, that the amount of nitrate produced even when .2 per cent NaCl is added to .35 per cent Na_2SO_4 is at least half again as large as that produced in cultures with the NaCl alone and no Na_2SO_4 added, and it is really not very far below the amount produced in the presence of Na_2SO_4 alone (a comparatively inoccuous salt) at the concentration just discussed.

The very astounding nature of the antagonism between NaCl and Na_2SO_4 as strikingly indicated in the foregoing tables and curves surely needs no further emphasis. It not only exists to a marked extent but it is shown above to be of the most vital practical significance and confirms more emphatically than the work on ammonification the contention of C. B. Lipman as made in work above cited not only that antagonism between anions exists, but also that it is very marked.

Series III. Na_2SO_4 versus Na_2CO_3.

The striking difference between the effects of Na_2CO_3 on the ammonifying and nitrifying flora of the some soil has been definitely pointed out and duly emphasized in other papers, as above stated, by one of us. This marked difference consists in the extreme toxicity of Na_2CO_3 for the nitrifying flora and its inoccuous nature, even in large concentrations, for the ammonifying flora. It is naturally of the greatest interest in antagonism work to test the power of salts to make harmless a very toxic salt through a mutual antagonism between the anions. Series III and IV therefore, and particularly the first, offer data of the greatest interest and importance in that



Percentages of Salts in Cultures.
Fig. 3.

they deal with that interesting salt Na_2CO_3 which is so toxic to many of the higher plants and to the nitrifying bacteria and yet so harmless to the mixed flora of ammonifying bacteria spoken of collectively.

The experiment in Series III was arranged like those in the foregoing series except that Na_2CO_3 was used throughout at a toxic concentration and varying amounts of Na_2SO_4 were added to the different cultures. The results obtained are shown in Table III which follows. See also Fig. 3 which shows the curve based on these data:

Table III.

Na_2SO_4 versus Na_2CO_3.

Culture No.	% Na_2CO_3 in dry soil	% Na_2SO_4 added to dry soil	N. as nitrate produced mgs. 1	N. as nitrate produced mgs. 2	Average N. as nitrate produced mgs.
1	0	0	23.52	23.24	23.38
2	.05	0	6.44	5.60	6.02
3	.05	.025	10.92	lost	10.92
4	.05	.050	11.20	10.64	10.92
5	.05	.100	17.08	20.72	18.90
6	.05	.200	25.76	29.68	27.72
7	.05	.300	28.84	26.88	27.86
8	.05	.400	28.56	30.80	29.68
9	.05	.500	25.20	26.60	25.90
10	.05	.600	19.60	23.58	21.14

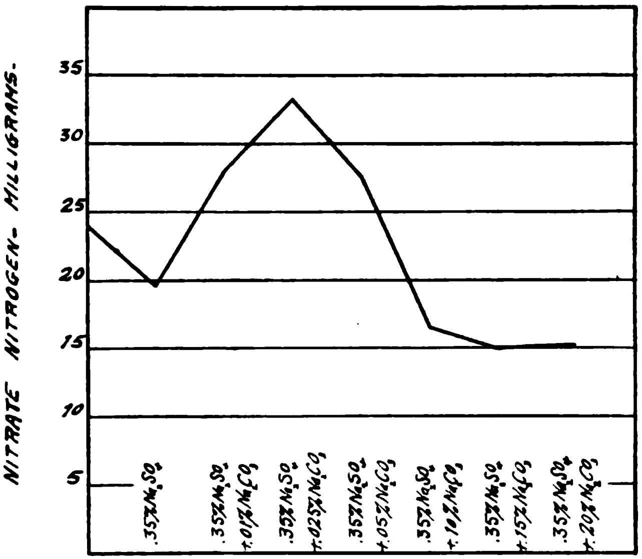
The marked toxicity of even so small a concentration of Na_2CO_3 as .05 per cent not only confirms the earlier findings of one of us on the toxicity of the alkali salts for nitrifying bacteria, but gives in Series III an excellent opportunity for noting the striking power of another ion to antagonize the $-CO_3$ ion or perhaps the $-OH$ ion which latter undoubtedly is to be found in considerable concentration in solutions containing Na_2CO_3. The antagonism between Na_2SO_4 and Na_2CO_3 manifests itself gradually in the additions of the lower concentrations of the first named salt to a constant concentration of the second of .05 per cent. Nevertheless, marked improvement can be noted in the nitrifying power of the soil even when .025 per cent Na_2SO_4 is added. Doubling the amount of Na_2SO_4 does not seem to induce much of an improvement but by further doubling the amount of Na_2SO_4 added to .05 per cent Na_2CO_3 very great improvement is brought about, the amount of nitrate produced being three times as great here as in the culture, in which the .05 per cent Na_2CO_3 alone is present.

The largest single increase in nitrate production in the series, however, occurs in the culture to which .2 per cent Na_2SO_4 is added to the constant concentration of Na_2CO_3. In that culture almost 9 mgs. of nitrate nitrogen more was produced than in the preceding culture to which was added only half the amount of Na_2SO_4 (.1 per cent). This large increase in nitrate production is further of more than relative value since it surpasses quite markedly the amount of nitrate produced in the normal soil free from alkali salts. The maximum nitrate production however is not attained until the amount of Na_2SO_4, added, is again doubled (.4 per cent) when the very large amount of nitrate 29.68 mgs. is produced. This fact, moreover, possesses another interesting phase since the amounts of both salts used in the culture in question are distinctly toxic to nitrification thus eliminating the question of the stimulating power of one of the salts used in an antagonistic combination. Despite that fact, however, we find in culture No. 8 of Series III not only the most emphatic argument in favor of the existence of strong antagonism between anions, but we actually have produced there a medium which is far superior for purposes of the nitrifying flora to the normal soil which is entirely free from salts while culture No. 8 contains .45 per cent of total salts. Larger additions of Na_2SO_4 than .4 per cent begin to decrease nitrate production below the point attained in culture No. 8, but .5 per cent Na_2SO_4 still allows of a distinctly larger nitrate yield than the normal soil and even an addition of .6 per cent Na_2SO_4 to the .05 per cent Na_2CO_3 allows of a production of nitrate which is not very far inferior to that produced in the "alkali free" soil of Culture No. 1.

In a general way there is a resemblance between the manner in which Na_2SO_4 inhibits the toxicity of Na_2CO_3 and that in which NaCl inhibits the toxicity of Na_2SO_4, (see Tables II and III), but the results are much more marked in the former case.

Series IV. Na_2CO_3 versus Na_2SO_4.

A reciprocal series is particularly interesting in this case since Na_2CO_3 is so toxic to the nitrifying bacteria. If .05 per cent of it in the soil is sufficient to decrease the nitrifying power of the soil, when used alone, by about 75 per cent it is naturally of great interest to determine how much larger amounts of Na_2CO_3 affect the bacteria in question when other salts are present. This question is well answered in Table IV and the curve in Figure 4 drawn on the basis there of. The experiment was carried out like the one immediately preceding except that Na_2SO_4 was used in all the cultures at the constant concentration of .35 per cent and the amounts of Na_2CO_3 were varied. The amounts of nitrate produced are shown in the following Table IV.



Percentages of Salts in Cultures.
Fig. 4.

We see again from the data in Table IV that marked antagonism exists between anions. Not only do non-toxic amounts of Na_2CO_3 like those in Cultures 3 and 4 obliterate the toxic effects of .35 per cent Na_2SO_4 for nitrifying bacteria but even a toxic quantity of that salt viz., .05 per cent Na_2CO_3 when added to the sulphate obliterates the toxicity of the latter besides showing in addition very definite stimulation. The amount of nitrates produced in culture No. 5 equal, 27.58 mgs. thus considerably exceeding the amount produced in the soil alone to which no alkali salt had beed added (See Culture II). Yet .35 per cent Na_2SO_4 alone allows of the production of but 19.46 mgs. nitrates and .05 per cent Na_2CO_3 alone only 6.02 mgs. nitrates. Nothing more striking need be cited as evidence of the existence of antagonism between the $-SO_4$ and the $-CO_3$ ions.

Table IV.

Na_2CO_3 versus Na_2SO_4.

Culture No.	% Na_2SO_4 in dry soil	% Na_2CO_3 added to dry soil	N. as nitrate produced mgs.		Average N. as nitrate produced mgs.
			1	2	
1	0	0	23.52	23.24	23.38
2	.35	0	19.04	19.88	19.46
3	.35	.010	26.60	29.40	28.00
4	.35	.025	31.64	34.72	33.18
5	.35	.050	32.48	22.68	27.58
6	.35	.100	15.68	16.80	16.24
7	.35	.150	13.44	16.52	14.98
8	.35	.200	15.40	lost	15.40

Another very astounding fact which is revealed by the data in Table IV is that the $-SO_4$ ion can so vigorously antagonize the $-CO_3$ or the $-OH$ ions that quantities of Na_2CO_3 amounting to .1 and .2 per cent still allow of the production in the presence of .35 per cent Na_2SO_4 of nearly two thirds as much nitrate as is produced in the normal "alkali free" soil. Yet those amounts of Na_2CO_3 alone as shown in work above cited not only absolutely inhibit nitrification but even cause a loss of nitrate from the original nitrate content of the soil.

It is at least worthy of mention further, that the largest yield of nitrates obtained in all the series described in this paper was obtained in Series IV. Culture No. 4 in which the nitrate production exceeded that of the "alkali free" soil by an amount equivalent to more than 40 per cent of the latter and exceeding the amount produced by the culture in which the .35 per cent Na_2SO_4 alone was present by 13.72 mgs. It is no less striking a fact, moreover, that in culture No. 4 more than 23 per cent of the nitrogen in the dried blood added was transformed into nitrate in one month.

Series V. **NaCl versus Na_2CO_3.**

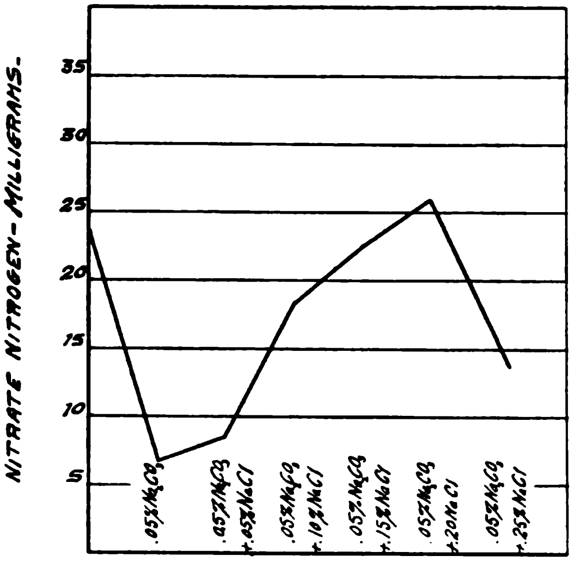
The reciprocal series between Na_2CO_3 and NaCl seemed next of interest, for in all the preceding series Na_2SO_4 was employed and that is toxic only in rather high concentrations to the nitrifying bacteria and its toxicity then only becomes gradually evident as shown above and in other work cited. With the Na_2CO_3 and NaCl however we are in a position to note antagonism of a marked type as shown below despite the fact that one of the salts is acutely toxic in small concentrations and the other also very toxic in relatively moderate concentrations. The experiment in this series was therefore arranged so as to bring out the interaction of the two salts as definitely as possible. Otherwise the method of the experiment was the same as that of preceding series. The results obtained in the first series of the two are given below in Table V.

It is evident from the data submitted in Table V that no stimulating concentration of the individual salts is necessary for purposes of producing antagonism between them. We are dealing here with at least some concen-

Table V.
NaCl versus Na_2CO_3.

Culture No.	% Na_2CO_3 in dry soil	% NaCl added to dry soil	N. as nitrate produced mgs. 1	N. as nitrate produced mgs. 2	Average N. as nitrate produced mgs.
1	0	0	23.52	23.24	23.38
2	.05	0	6.44	5.60	6.02
3	.05	.05	7.84	8.96	8.40
4	.05	.10	16.80	19.60	18.20
5	.05	.15	22.12	22.96	22.54
6	.05	.20	29.40	22.40	25.90
7	.05	.25	14.84	15.82	15.33

trations of both salts which are markedly toxic, and yet combinations of such concentration, so far from being toxic are notably stimulating to the nitrifying bacteria. To illustrate, let us examine for a moment the data obtained from Culture No. 6. We have there a combination of .05 per cent Na_2CO_3 and 2 per cent NaCl. The first alone reduces the amount of nitrate produced from 23.38 to 6.02 mgs. The second alone reduces it from 23.38 to 10.50 mgs. When, hovewer, we add the two together we obtain 25.90 mgs. or even more if one of the two determinations in that instance is accepted, as is entirely justified, it would seem, from the duplicate determinations of similar cultures given in Table VI below. Even with so toxic a concentration of NaCl as .25 per cent which alone almost inhibits nitrification, we can obtain about two thirds of the normal yield of nitrate if we add to it .05 per cent Na_2CO_3, despite the fact that the latter by itself only allows 25 per cent of the normal amount of nitrate to be produced. We are thus confronted by definite instances of marked antagonism between anions employed at concentrations at which each member of the combination is indubitably toxic to the nitrifying flora.



Percentages of Salts in Cultures.
Fig. 5.

The most remarkable feature of the data in Table V as it appears to us, or, at least next most remarkable to the striking fact of the antagonism itself, is the much more marked power of larger and more toxic concentrations of NaCl to antagonize and obliterate the toxic powers of .05 per cent Na_2CO_3. It is usually found to be the case in antagonism work that when a salt in varying quantities is matched against another toxic one in constant quantity that the most beneficial culture is obtained at such combinations of the two salts as contain the varying salt in stimulating concentrations. In the foregoing table, however, we are confronted by a totally different condition and though it is not the only instance of that phenomenon noted in the data submitted in this paper, it is by all odds the most striking illustration thereof as indicated in the example above discussed. It is further of very great interest to observe in Table V that the smaller concentrations of NaCl which may stimulate nitrification when alone (at times quite markedly, as in the case of .03 per cent to .05 per cent NaCl) are but feeble in their antagonism to Na_2CO_3 at .05 per cent concentration but the NaCl gains power in that direction as it inrceases in concentration despite the fact that it may in thus becoming much more concentrated reach a point where it alone is actually toxic as illustrated above. Thus .05 per cent Na Cl improves the soil as a medium for nitrification when added to .05 per cent Na_2CO_3, but very slightly for the nitrifying bacteria, NaCl at .10 per cent does it much more markedly, in fact brings about the greatest change which occurs between any two succeeding cultures in Series V (See Cultures 3 and 4), but .15 per cent NaCl and finally .20 per cent NaCl give respectively the next highest and highest yields of nitrates thus exhibiting the largest degree of antagonism. After .2 per cent NaCl the further additions of Na Cl, while still exhibiting marked antagonism to .05 per cent Na_2CO_3 as above explained begin to show the toxicity due to marked changes in osmotic pressure as well as other changes resulting from high salt concentrations.

The data in Table V are in many ways the most remarkable group of results given. They illustrate definitely the existence of antagonism between ions, of antagonism at toxic concentrations of both ions used in a combination, exhibit very marked antagonism, and finally show toxic concentrations of certain ions to be capable of obliterating the toxic effects of other ions most strikingly when much smaller, and stimulating concentrations of the first named ions are only capable of inducing antagonism very feebly.

Series VI. Na_2CO_3 versus NaCl.

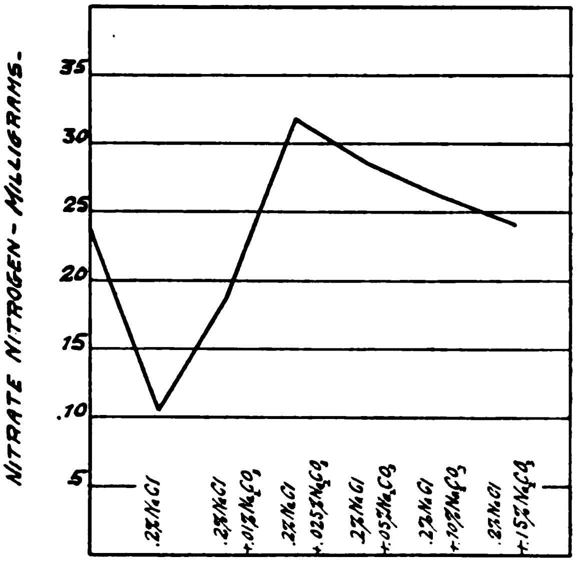
This final series forms the reciprocal of Series V. It was intended like the other reciprocal series for the purpose of disclosing the finer points of departure from the expected effects of the salts which are not shown by the use of merely one salt in constant toxic concentration. In fact the several points of difference between Series V and VI as seen by a comparison of Tables V and VI indicate clearly the importance and even the absolute necessity of such reciprocal series.

The experiment with similar arrangement to the foregoing resulted in the data obtained in Table VI which follows (See also Fig. 6 which shows curve based on data in Table VI.)

Table VI.
Na_2CO_3 versus NaCl.

Culture No.	% NaCl in dry soil	% Na_2CO_3 added to dry soil	N. as nitrate produced mgs.		Average N. as nitrate produced mgs.
			1	2	
1	0	0	23.52	23.24	23.38
2	.20	0	10.08	10.92	10.50
3	.20	.010	17.36	20.44	18.90
4	.20	.025	33.60	30.24	31.92
5	.20	.050	30.80	26.88	28.84
6	.20	.100	23.80	29.12	26.46
7	.20	.150	26.88	22.40	24.64

Similar effects on the interaction of anions are noted in Table VI to those portrayed in Table V. One additional interesting point, however, is worthy of further mention in the first named series of results. We find there that despite the high concentration of salts in Culture No. 7 we do not obtain a toxic combination, more nitrate being produced there than in Culture No. 1, which contained no alkali salts. Such extremely toxic concentrations of Na_2CO_3 as .15 per cent and of NaCl as .2 per cent when used alone seem to counteract mutually their poisonous effects when the two are combined in the same culture. No combination of the two salts used in Series VI has shown any toxic effect on the nitrifying bacteria except the combination of .2 per cent NaCl and .01 Na_2CO_3. In that case the antagonistic effect of the last named salt while being truly remarkable is none the less too small to allow of the normal production of nitrates.



Percentages of Salts in Cultures.
Fig. 6.

Throughout the balance of the series the salt combinations not only effect a vigorous antagonistic action which results in normal nitrate production but actually allow of a stimulating action so that more nitrates are produced in any of the cultures than is produced in the normal alkali free soil. The yields of nitrates are so large indeed that they amount to 1½ times the nitrate production in Culture No. 2, in which .2 per cent NaCl alone is present.

We see thus a marked similarity in the interaction of the anions of NaCl and Na_2CO_3 as affecting nitrification to that displayed in the antagonistic action of the same anions as affecting ammonification obtained by one of us in work above referred to. In the latter also the addition of larger and larger amounts of Na_2CO_3 to the NaCl induced constantly increasing ammonia production. The difference however between the two cases lies in the fact that Na_2CO_3 is very toxic to nitrification while being markedly stimulating to ammonification. The phenomenon is therefore all the more striking in the case of the data submitted above in Table VI.

General Discussion of the Results.

The most emphatic evidence so far obtained in support of the existence of antagonism between anions and their undoubted practical significance is clearly given in the results and remarks above submitted. The latter serve not merely to confirm similar effects obtained with the ammonifying flora of the same soil but markedly to strengthen it. In support of the latter statement it must be pointed out that a considerable portion of the data obtained with the ammonifying flora involved such as were obtained through the interaction of Na_2CO_3 or its anions with other anions. The latter is however a stimulant to ammonification in soils and it might be argued that when added to another salt its great stimulating power to ammonification is merely reduced by the presence of another and toxic salt, thus constituting in the minds of some investigators a doubtful case of antagonism. But, in the work on nitrification above discussed there is no room for such objection since large and very toxic concentrations of the two ions intended to antagonize each other in the various series of experiments were employed and still the most marked cases of antagonism were obtained.

Regardless, therefore, of what the theoretical considerations of the true nature of antagonisms between ions may be, we have submitted data above to show even to the supporters of the more narrow connotation of the term that striking antagonism exists between anions even if the two matched against each other are employed in markedly toxic concentrations. The reader is referred for a fuller discussion of the theoretical aspects of the question to the work on ammonification above cited. Suffice it to say, here, that ample evidence is given above of true antagonism between anions irrespective of the theoretical discussion involved.

It must also be added here that the results which we have obtained in antagonism work on anions as affecting nitrification is not only astounding evidence on the side of the more narrow phases of the subject here taken up but constitutes further in our opinion one of the most remarkable examples of the general idea of antagonism between salts thus far obtained in the realm of biology in general.

The next question of general interest with reference to the results above given is concerned with the concentrations at which anions may be safely combined in field soils to allow of the normal activation of soil organisms and the successful growth of plants. In this connection it must be remarked that we have had for some time under way in pot cultures, under greenhouse conditions, a series of experiments dealing with antagonism between the same anions as those above studied as affecting the growth of barley. Results similar in nature to those given for the ammonifying and nitrifying bacteria, though not so striking have also been obtained with the higher plants, It is next planned to correlate all these results together with another series soon to be published which deals with the soil's nitrogen fixing flora and to determine from such correlations how to control the alkali content of field soils for profitable crop production. We are going beyond greenhouse experiments along this line, in fact, and are making a study of the alkali resistance of plants under field conditions, and grown under known and controlled alkali conditions in deep cylinders. In this work also, the combinations of various salts are to be studied to determine how salts may be combined in soils so as not to affect the normal growth of plants.

Correlating the results obtained by one of us on the relations of alkali salts to nitrogen transformation with those discussed above we find that for the proper transformation of organic nitrogen certain combinations of the three common alkali salts are permissible in the soil without hindrance and even with considerable stimulation to the processes of ammonification and nitrification. Thus, both ammonification and nitrification may be made to go on practically normally in the presence of a total alkali content of .45 per cent consisting of .2 NaCl and .25 per cent Na_2CO_4. If Na_2CO_3 is present at the concentration of about .1 per cent either .2 per cent NaCl or .35 per cent Na_2SO_4 may be added to it, and still permit of good nitrogen transformation. If a large quantity of Na_2SO_4 be present, for example, .6 per cent, we may add to it .05 per cent Na_2CO_3 and bring about almost normal conditions for nitrification.

Our results therefore indicate definite concentrations of any two of the three alkali salts which may be combined in soils, if the flora we have been working with are to be considered representative, in order that no one salt may interfere with the proper transformation of organic nitrogen in the soil, a process which is essential to the normal growth of most plants.

We to not intend however to stop at combinations of two salts or ions in our attempt to induce through the antagonistic action of ions as good or better conditions for nitrogen transformation and for plant growth than exist in „alkali free“ soils. Among the succeeding phases of our work will be an attempt to combine all three of the common alkali salts and determine in what proportions they may exist in the soil and still allow of the normal functioning of the plant and the soil bacteria. We shall thus attempt, with Loeb's conception of the physiologically balanced solution in view, to determine what constitutes, as it were, a proper physiologically balanced soil solution. Moreover, we shall undertake in these studies not only the task of arriving at a physiologically balanced medium through the interaction of the „alkali“ salts named above, but also shall endeavor to make use of the well known antagonistic action of basic ions to each other and to anions and thus have a larger variety, and more formidable, weapons to employ in our campaign with the „alkali“ problems.

Altogether, the antagonism between salts, taking into consideration also the stimulating effects which may result indirectly to plants and soil bacteria from them, seem to offer a most hopeful method for the reclamation of many soils which now, it would seem, are barren, not merely because of the high osmotic pressures produced in the soil solutions through high salt concentrations but owing to the improper balancing of salts and ions in their total salt content. Without desiring to be overenthusiastic in this matter we believe that the data adduced from our experiments gives us justification for the idea just expressed.

As for the scientific phase of the subject under consideration it must be admitted by all who have any acquaintanec with it that it is nothing short of fascinating to note with what marked regularity and distinctness living protoplasm will react variously with the intreaction of ions. We earnestly hope that more modern methods of research may soon reveal the mechanism of the antagonism between ions which now forms one of the most important problems in the field of salt antagonisms.

Conclusions.

1. Marked antagonism exists between the anions of Na_2CO_3, Na_2SO_4 and NaCl when a soil's nitrifying power is the criterion.

2. Such antagonism is obtained when the salts are employed in both toxic, one toxic and one stimulating, and both stimulating concentrations.

3. Even in cases of combinations of salts in which both are toxic not only normal nitrification but stimulated nitrification may be induced.

4. The following are the combinations of salts which have given the most marked antagonisms often being accompanied by marked stimulation.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

a) When .2 per cent NaCl is the toxic salt- an addition of .05 per cent Na_2SO_4 or an addition of .025 per cent Na_2CO_3.

b) When .35 per cent Na_2SO_4 is the toxic salt an addition of .15 per cent NaCl or an addition of .025 per cent Na_2CO_3.

c) When .05 per cent Na_2CO_3 is the toxic salt an addition of .4 per cent Na_2SO_4 or an addition of .2 per cent NaCl.

5. While these are the combinations producing the largest amounts of nitrates, very large amounts of the latter are often produced by much larger additions of the second salt to the toxic salt used as a constant.

6. These results when correlated with similar results on ammonification and nitrogen fixation obtained by us and also with those obtained on the higher plants, along similar lines, give definite indications for the combination of alkali salts as a measure in alkali land reclamation.

Nachdruck verboten.

A Study of the bacterial Activities of virgin and cultivated Soils.

[Utah Experiment Station, Logan, U. S. A.]

By **J. E. Greaves.**

Nitrogen is a limiting factor of crop production in most soils and the transformations through which it passes in the soil or on being taken from its inert form in the atmosphere are all brought about either directly or indirectly through the activity of bacteria. Furthermore, they play an essential part in the cycle of transformation through which hydrogen, sulfur and carbon passes. And they take no small part in the changes through which calcium, iron, phosphorus and probably other inorganic constituents of the soil pass. They are continually at work, sometimes making the plant food of the soil more available, at other times competing with the higher plants for the limited supply of food. For these reasons any work which has as its aim a determination of the influence which our present agricultural methods have upon the bacterial flora of the soil, is of great practical importance.

Many of the soils of Utah at the present time offer exceptionally favorable conditions for such a study. In many places the soils have been tilled under conditions which can be fairly accurately determined at the present time. Some of them having been cultivated by the same individual and in some places to the same crop for upward of forty years. Along side of such a soil in many places is to be found undisturbed virgin soil covered with its native vegetation. This being the case it gives an opportunity to compare by our present methods the bacterial activities of the two sets of soils. A chemical study of these soils has already been made by Dr. Stewart[1]) and it brings out the very interesting fact that many of these long cultivated soils contain more total nitrogen in the surface foot of soil than do the virgin soils, thus showing an inherent difference from most long cultivated soils. It also emphasizes another difference which was brought out by previous workers[2]), and that is the soils of the arid regions are very low in nitrogen but they are abundantly supplied with all the other elements of plant food and in many cases they are exceptionally high in calcium carbonate. These are facts which should be born in mind in a consideration of the data reported in this article.

---

[1]) Stewart, Utah Exper. Stat. Bull. No. 109.

[2]) Widtsoe, Utah Exper. Stat. Bull. 52.

Method of Sampling. All possible precautions were taken in the collecting of samples against the contamination of one sample by another. The surface soil to a depth of one-half inch was scraped of by means of a sterile spade. A hole twelve inches deep was dug and a slice of soil to the depth of twelve inches was taken from the side of the hole and placed in a sterile mixing pan. This process was repeated from four or five places in the field and then the contents of the pan carefully mixed by means of a sterile spatula. From this composite sample a representative portion, about five pounds of soil, was placed in sterile sacks and conveyed to the laboratory for analysis. During the first part of the work the samples were collected in sterile manila bags, but later it was found that better results were obtained by using double sterile ore sacks. This did away with the danger of breakage and loss of sample in transit to the laboratory.

Before each sampling, the spade, mixing pan and spatula were all carefully sterilized by heat from a plumber's torch. This prevented the transference of the soil organisms from the cultivated to the virgin soil or vice versa. The samples were immediately transferred to the laboratory partly air dried in the dark and then ground in a sterile mortar and all coarse rocks removed. The analysis was commenced in all cases within twenty four hours of the time of taking the sample.

The soils used in this work were taken at different times during the summer of 1913 extending from June first to October fifteenth, and they represent soil from nine different farms. They are all from Cache Valley and with one exception are all from arid farms. They were all taken within a radius of forty five miles within the basin of what used to be the Cache Bay of the Lake Bonneville. The soils were originally formed from the nearby mountains which are composed largely of quartzite and limestone. As the rivers flowed into the lake loaded with debries from the nearby mountains their load was deposited in various grades of fineness, so that these soils represent a great variation in physical composition, but are quite similar in chemical composition.

Following is a description of the various soils analyzed: Soils Nos. 1 to 4 inclusive are black loam of very light texture, higher in nitrogen and humus than any of the other soils. They are well supplied with phosphorus, potassium and calcium carbonate. Soil No. 1 has grown potatoes for 23 years, after this it was planted to oats for 2 years and during the last 4 years has been into alfalfa. It has received some manure. Soil No. 2 has grown alfalfa continuously for the last 29 years and has received no manure. Soil No. 3 has been into wheat for 26 years. Until 1907, wheat was grown continuously. Since that time it has been fallowed every other year. Soil No. 4 is virgin adjoining the above and was covered with weeds, wild grass and sage brush.

Soils Nos. 5 and 6 are sandy loam of a much lighter color than No. 1. They have less humus and nitrogen, but an abundance of the other elements. Soil No. 6 has been cultivated for 28 years and during this time has been fallow two summers. The remainder of the time it has been into wheat. Soil No. 5 is from land adjoining No. 6 and is virgin and is covered with sagebrush and bluegrass.

Soils Nos. 7, 8, 9 and 10 are loam and contain less sand than the preceding. They are higher up on the delta and contain even less nitrogen and humus than Nos. 5 and 6. They are well supplied with phosphorus, potassium and calcium carbonate. They are very fertile soils. No. 7 has been cultivated for 22 years. During the first 18 years it was planted to wheat continuously, but during the last four has been into alfalfa. No. 8 has also been cultivated for 22 years. The first six to wheat, then alfalfa 14 years, and wheat during the last two years. No. 10 has been cultivated for 22 years and during this time it has been fallowed every third year. No. 9 is virgin, adjoining above and is covered with bluegrass and sagebrush.

Soils Nos. 11, 12, 15 and 16 are clay loams. They are very deficient in humus and nitrogen, but well supplied with the other elements of plant food, and are very productive. The cultivated soils have been irrigated for the last 30 years. Soil No. 12 was cropped to alfalfa for 28 years, four years of this time it was used as a pasture. During the last three years it has been into wheat. No. 11 is virgin, adjoining No. 12, and was covered with bluegrass and sagebrush. For several years there was a straw stack very near and it is quite possible that considerable of the decaying straw has been transferred to this soil. Soil No. 15 has been into alfalfa for 27 years, and No. 16 represents the adjacent virgin soil.

Soils Nos. 13 and 14 are heavy clay, light in color and almost devoid of humus. The nitrogen is low, but they are well supplied with phosphorus and potassium and calcium carbonate. While wet they are exceedingly sticky, and on drying they bake like an adobe. No. 13 has been tilled for 23 years and has been fallow 3 years. The rest of the time it has been into wheat. No. 14 represents adjacent virgin and was covered with weeds and bluegrass.

Soils Nos. 17, 18 and 19 are clay loam, light color, fairly high in humus and nitrogen. They are bottom lands and very close to alkali lands. They are very fertile. No. 17 has been into wheat 15 years and fallow every other year. No. 19 has been in alfalfa for 26 years and No. 18 is adjacent virgin and is covered with a slough grass.

Soils Nos. 20, 21, 22 and 23 are sandy soils, low in humus and nitrogen and probably not so well supplied with phosphorus as the rest of the soil. No. 20 has been cropped to alfalfa for 30 years, while No. 21 has been into alfalfa 17 years and wheat during the last three. No. 22 has been farmed to wheat for 20 years with occasional fallowing. No. 23 is from the adjoining virgin which was covered with weeds and grass.

Soils Nos. 24, 25 and 26 are clay soils containing a trace of alkali and of a reddish color. They have a medium supply of nitrogen and humus but probably sufficient of the other elements of plant food. No. 24 has grown alfalfa continuously for 26 years, while No. 26 has been farmed to wheat for 27 years, with fallow every third year. No. 25 is from adjoining virgin.

Soils Nos. 27, 28, 29, 30 and 31 are very fine sandy loam, with just a fair supply of humus and nitrogen, but well supplied with the other elements of plant food. No. 27 has been used as a vegetable garden for the last 35 years and has received considerable manure. No. 28 has been into alfalfa for 35 years, while 30 and 31 have been farmed to wheat for 35 years, the first being fallowed every third year, while the second has been fallowed every other year. No. 29 is from adjoining virgin which was covered with weeds and grass.

The following determinations were made on each sample of soil: (1) Number of organisms which developed in four days on synthethic agar; (2)

Ammonia formed in four days in 100 grams of soil, to which was added two grams of dried blood; (3) Nitric nitrogen formed in ten days in 100 grams of soil, to which two grams of dried blood had been added; (4) Nitrogen fixed during eighteen days in 100 grams of soil, to which was added 1.5 grams of mannite.

I Number of Organisms.

The number of organisms were determined by growing on „modified“ synthetic agar, having the following composition:

'000 cc. of distilled water,
10 grams of dextrose,
.5 gram of K_2HPO_4,
.2 gram of $MgSO_4$,
2 grams of powdered agaragar per 100 cc. of media.

Table I.

Giving Colonies which developed in four days at 28° C on the Synthetic Agar.

No.	No. of determinations in average	Description	Crop Growing when sampled	Colonies on Synthetic agar	+ greater — less than in virgin
1	4	Green Farm Potatoes 23 yrs. Oats 2 yrs. alfalfa 4 yrs.	alfalfa	5,600,000	3,200,000
2	4	Green Farm alfalfa 29 yrs.	alfalfa	2,900,000	500,000
3	4	Green Farm Virgin	grass	2,400,000	
4	4	Green Farm wheat 26 yrs.	fallow	3,800,000	1,400,000
5	4	Riter Farm virgin	grass	4,400,000	
6	4	Riter Farm wheat 26 yrs.	wheat	5,200,000	800,000
7	4	Holmes Farm wheat 18 yrs. alfalfa last 4 yrs.	alfalfa	7,400,000	3,500,000
8	4	Holmes Farm wheat 6 yrs. alfalfa 14 yrs. wheat 2 yrs.	wheat	8,500,000	4,600,000
9	4	Holmes Farm Virgin	grass	3,900,000	
10	4	Holmes Farm wheat 22 yrs.	wheat	7,800,000	3,900,000
11	4	Greaves Farm Virgin	grass	2,200,000	
12	4	Greaves Farm alfalfa 28 yrs. wheat 3 yrs.	wheat	1,500,000	— 700,000
13	3	Miller Farm wheat 20 yrs.	fallow	1,300,000	— 200,000
14	3	Adjacent Virgin	grass	1,500,000	
15	2	Greaves Farm alfalfa 27 yrs.	alfalfa	3,200,000	1,500,000
16	2	Adjacent virgin	grass	1,700,000	
17	2	Peterson Farm wheat 15 yrs.	wheat	5,400,000	3,200,000
18	2	Peterson Farm adjacent Vir.	grass	2,200,000	
19	2	Peterson Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	2,100,000	— 100,000
20	2	Partington Farm alfalfa 30 yrs.	alfalfa	2,600,000	1,400,000
21	2	Partington Farm alfalfa 17 yrs. wheat last 3 yrs.	wheat	5,900,000	4,500,000
22	2	Partington Farm wheat 20 yrs.	wheat	2,400,000	1,000,000
23	2	Partington Farm virgin	grass	1,400,000	
24	3	Edwards Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	5,600,000	3,200,000
25	2	Edwards Farm virgin	grass	2,400,000	
26	2	Edwards Farm wheat 27 yrs.	wheat	6,900,000	4,500,000
27	2	Farrell Farm vegetable garden 35 yrs.	corn and beans	5,300,000	4,700,000
28	2	Farrell Farm alfalfa 35 yrs.	alfalfa	2,900,000	2,300,000
29	2	Farrell Farm adj. virgin	grass	600,000	
30	2	Farrell Farm wheat 35 yrs.	wheat	4,300,000	3,700,000
31	2	Farrell Farm wheat 35 yrs.	fallow	3,900,000	3,300,000

The samples of soil were carefully mixed by shaking and then 100 grams weighed on a sterile watch glass, using a small sterile spatula. This soil was transferred to 200 cc. of sterile water and shaken for one minute. One cc. of this transferred to 99 cc. of sterile water and this continued with 9 cc. blanks. The plates were made so as to give a dilution of 1 to 20,000 and 1 to 200,000. They were incubated at 28° to 30° C. for four days and then counted, using a small hand lense. No attempt was made to differentiate between moulds and bacteria, but all were listed together. The results are given in Table I and each reported result is the average of a number of determinations.

Examining the above results we note a wide variation in the number of organisms in the different soils. It varied all the way from 600,000 per gram of soil in the case of virgin soil of the Farrell farm up to the eight and one half millions in the case er the wheat soil of the Holmes farm. The number of organisms found are apparently highest in the lighter loam soils, and less in the case of the heavy clay. With three exceptions, samples 12, 13 and 19 the number of organisms in the cultivated soils is higher than in the virgin. In the cases where the number is greater in the virgin than in the cultivated the difference is small, and occurs in the heavier soils having few organisms. In the ones where the reverse is true, there is often twice as many organisms in the cultivated as there are in the virgin soil. This surely does not indicate the accumulation of a substance toxic to bacteria by long cultivation of soil to the same crop. But this taken in connection with the findings of Stewart[1]) that in many cases the surface foot of these cultivated soils contain more nitrogen than the corresponding virgin soil confirms in a degree the contentions of Caron[2]). However, the specific physiological groups and probably the physiological efficiency of the individual organisms counts for more than mere numbers. The number of organisms in the soil of the Greaves Farms are low. This is probably due to the physical conditions of the soil and the low percent of organic matter present, and not to the irrigation water used on this farm. That this is the case is supported by the fact that the Miller Farm, which is an arid farm, is a much heavier clay and probably has less organic matter and gives a very low count of colonies. As brought out by these results we find the greatest number of colonies developing from the wheat soil, followed in the order named by fallow, alfalfa, and virgin. This is emphasized in tabular form in Table II. In making the averages, soils Nos. 1 and 27 have been placed with the fallow as they are hoed crops and could not be placed with any of the others. Furthermore, manure had been applied to each. Those placed under fallow contain too few samples and are too diversified as to treatment to be used to draw any conclusions from as to the real effects of fallowing. Yet they are of interest to compare with their adjoining virgin soils and to show the relationship existing between the various bacterial activities of these soils.

Table No. II giving the average number of organisms found in soils under the several conditions:

Cultivated	4,452,000
Virgin	2,270,000
Main Crop Grown, Wheat	4,840,000
Main Crop Grown, Alfalfa	3,911,000

---

[1]) Stewart, Utah Exper. Stat. Bull. 109.

[2]) Caron, Landw. Vers.-Stat. 45. 1895. p. 402.

Crop when sampled, wheat	5,322,000
Crop when sampled, alfalfa	3,814,000
Crop when sampled, fallowed . . .	3,980,000

The numerical value is slightly changed when we average in the one case as crop grown and in the other case as crop growing when sampled, but the general relationship remains about the same in each case. The average number found in the cultivated is over twice that found in the virgin and there is nearly twice as many in the wheat land as in the alfalfa land, the alfalfa land being much more nearly like the virgin soil, but even here there is a safe margin in favor of the cultivated soil.

Ammonification.

The ammonifying power of the soils was determined as follows: tumblers covered with Petri dishes were sterilized and into these were weighed 100 gram

Table III.

Giving milligrams of Ammonia formed in four days in 100 grms of soil to which was added two grams of dried blood.

No. of Soil	No. of determinations	Description	Crop when sampled	Milligrams of ammonia formed	greater-less than in virgin
1	3	Green Farm potatoes 23 yrs. Oats: 2 yrs., alfalfa 4 yrs.	alfalfa	117.98	82.69
2	2	Green Farm alfalfa 29 yrs.	alfalfa	41.14	5.85
3	2	Green Farm virgin	grass	35.29	
4	2	Green Farm wheat 26 yrs.	fallow	69.04	33.75
5	2	Riter Farm virgin	grass	81.43	
6	2	Riter Farm wheat 26 yrs.	wheat	83.62	2.19
7	4	Holmes Farm wheat 18 yrs. alfalfa 4 yrs.	alfalfa	31.11	—27.52
8	4	Holmes Farm wheat 6 yrs. alfalfa 14 yrs., wheat 2 yrs.	wheat	46.38	—12.25
9	4	Holmes Farm virgin	grass	58.63	
10	4	Holmes Farm wheat 22 yrs.	wheat	29.75	—28.88
11	2	Greaves Farm virgin	grass	37.06	
12	3	Greaves Farm alfalfa 28 yrs. wheat 3 yrs.	wheat	39.44	2.38
13	4	Miller Farm wheat 20 yrs.	fallow	57.46	21.05
14	4	Miller Farm virgin	grass	36.41	
15	3	Greaves Farm alfalfa 27 yrs.	alfalfa	52.19	14.71
16	3	Greaves Farm virgin	grass	37.48	
17	4	Peterson Farm wheat 15 yrs.	wheat	39.27	—20.27
18	4	Peterson Farm virgin	grass	59.50	
19	4	Peterson Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	26.69	—32.81
20	2	Partington Farm alfalfa 30 yrs.	alfalfa	70.05	31.82
21	2	Partington Farm alfalfa 17 yrs. wheat 3 yrs.	wheat	129.88	91.65
22	2	Partington farm wheat 20 yrs.	wheat	56.27	18.04
23	2	Partington Farm virgin	grass	38.23	
24	3	Edwards Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	28.65	.60
25	3	Edward Farm virgin	grass	28.05	
26	2	Edwards Farm wheat 27 yrs.	fallow	76.84	48.79
27	2	Farrell Farm vegetable garden 35 yrs.	corn, etc.	115.26	78.54
28	4	Farrell Farm alfalfa 35 yrs.	alfalfa	20.23	—16.49
29	4	Farrell Farm virgin	grass	36.72	
30	4	Farrell Farm wheat 35 yrs.	wheat	20.06	—16.66
31	2	Farrell Farm wheat 35 yrs.	fallow	65.96	29.24

portions of the soil and two grams of dried blood. The dried blood was thoroughly mixed with the soil by means of a sterile spatula and the water content made up to 18 percent with sterile distilled water. The samples were incubated at 28° C to 30° C for four days and the ammonia determined by transferring to Kjeldahl flasks wiht 250 cc. of distilled water, adding 2 grams of magnesium oxide and distilling into n/10 sulfuric acid solutions. The determinations were all made in duplicates and compared with sterile blanks, so that each reported result is the average of two or more closely agreeing determinations. The results are reported as milligrams of ammonia formed in 100 grams of the soil. The results are given in Table III.

An examination of the above results shows there to be a wide variation between the different soils. In the case of the Green and Riter soils, both light loams, the ammonia produced in the cultivated soil is considerable higher than in the virgin. But we find just the reverse to be the case with the soil from the Holmes farm. Here we find that every soil examined, and it was the case with each specific examination, the virgin soil produced considerable more ammonia than did the cultivated soil. This same condition is found to exist in the case of the Peterson farm and two samples from the Farrell farm. The other seven farms examined gave higher results for the cultivated than for the virgin. This lack of uniformity observed in these soils can scarcely be attributed to a diference in the physical conditions of the soil for the same phenomena does not always occur in soils of the same physical conditions. Nor can it be attributed to a difference in the moisture content of the soil at time of analysis, for the moisture content was made so that they did not vary one from the other over ome percent. And furthermore a great number of the soils were retested as to their ammonifying powers after they had been kept in the laboratory in an air dried condition for three months, and they invariably gave results similar to those reported, differing only in that the results were lower than the ones here reported. They all, however, bore the same relationship to their respective virgin sample. It appears, therefore, that in the ammonifying series no such regularity is found as was noted in the case of the numerical counts. There is, however, a tendency for the cultivated soils to yield higher results than do the uncultivated soils. This is brought out more clearly by averaging the results for the soil under the various conditions. In the average the potato soil and garden soil are placed with the fallow soil. The results are given in Table IV.

Table IV.

Giving the average quantity of Ammonia in Milligrams, produced by the various Soils.

Cultivated	57.97
Virgin	44.88
Main crop grown, wheat	52.94
Main crop grown, alfalfa	50.52
Crop when sampled, wheat	55.58
Crop when sampled, alfalfa	38.58
Crop when sampled, follow	83.76

Here we find quite a difference existing between the ammonia formed in the cultivated and virgin soil. And if the average be made without soils Nos. 1 and 21, both of which are much higher than the average, and No. 1 would be abnormal as it has received manure, still the cultivated soil averages higher than the virgin. The fallowed or hoed crop soils average highest in

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

the series. While the wheat soil averages higher than the alfalfa. In fact there seems to be a direct relationship between the cultural methods and the power of the soil to produce ammonia, and it would seem as if this played a greater part in the changing of the ammonifying powers of the soil than does the crop itself, although the crop does undoubtedly play some part. These results tend also toward the conclusion that the treatment which the soil had received, or was receiving the year in which it was sampled plays a greater part in determining its activity than does past treatment. It must, however, be admitted that this latter does take some little part in the modifying the bacterial flora of the soil.

The Nitrifying Powers of the Soil.

In spite of the findings of many recent investigators that some plants can assimilate in a certain degree ammonia and probably other forms of nitrogen, it still remains a fact that the main nitrogen supply of the growing plant is the nitrates present or being formed in the soil. So that any change either in physical or chemical composition which changes the powers of the soil to produce nitric nitrogen must of necessity react upon the plants growing upon the soil. It is, therefore, of considerable practical as well as theoretical value to find out the influence of cultivation upon a soils power to produce nitrates.

The nitrifying powers of the soils described in the preceding series were determined as follows: Beakers covered with Petri dishes were sterilized and into these were weighed 100 gram portions of the soil to be tested, together with two grams of dried blood. Sufficient sterile distilled water was added to make the moisture content of the soil 18 percent. The tumbler together with its contents were weighed and the moisture content made up every four days to 18 percent.

The soils were incubated at 28° to 30° C. for ten days, and the nitrates determined by transferring the soil by means of 250 cc. of distilled water to a mortar containing 2 gms. of powdered lime. The soil was triturated for 2 minutes by the watch and then transferred to a closed bottle and allowed to stand until clear. This usually required about two hours. At the end of this time an aliquot portion, 25 cc. was measured into 100 cc. beakers and evaporated just to dryness. The nitric nitrogen was then determined by the regular phenol-disulphonic acid method. The determinations were all made in duplicate and the results reported are the average of a number of closely agreeing determinations. The soils were incubated for only ten days, as it was thought likely differences would be obliterated if the soils were incubated the regular 21 days. Recent work, however, tends to show that in place of obscuring the differences, the longer incubation tends to make them more pronounced. The results obtained for the various soils are given in Table V.

The above results show a great variation in the nitrifying power of the different soils. In the case of the light loam soils, as a rule the nitrifying powers are high, while in the case of the clay soil it is very low. In the case of the first fourteen samples the cultivated soil invariably produces more nitric nitrogen than does the virgin soils. With some of the remainder the reverse is true, but this is less than one-half of the remainder of the samples. Furthermore the excessive amount produced in the virgin soil is always very small and it occurs only in the case of the soils where the amount of nitric nitrogen produced was extremely small. Many of the samples were

Table V.
Giving Milligrams of Nitric Nitrogen formed in ten days in soil containing 2 grams of Dried Blood.

No.	Description	Crop when sampled	Mg. Nitric nitrogen formed	+ Greater — less than in virgin
1	Green Farm potatoes 23 yrs., Oats 2, alfalfa 4 yrs.	alfalfa	12.67	10.99
2	Green Farm alfalfa 29 yrs.	alfalfa	3.04	1.36
3	Green Farm virgin	grass	1.68	—
4	Green Farm wheat 26 yrs.	fallow	1.86	.18
5	Riter Farm virgin	grass	7.62	—
6	Riter Farm wheat 26 yrs.	wheat	20.34	12.72
7	Holmes Farm wheat 18 yrs., alfalfa last 4 yrs.	alfalfa	1.17	.38
8	Holmes Farm wheat 6 yrs., alfalfa 14 yrs. wheat 2 yrs.	wheat	1.26	.47
9	Holmes Farm virgin	grass	.79	—
10	Holmes Farm wheat 22 yrs.	wheat	.80	.01
11	Greaves Farm virgin	grass	.20	—
12	Greaves Farm alfalfa 28 yrs., wheat 3 yrs.	wheat	.75	.55
13	Miller Farm wheat 20 yrs.	fallow	2.	.05
14	Adjacent virgin	grass	1.95	—
15	Greaves Farm alfalfa 27 yrs.	alfalfa	.36	—1.11
16	Greaves Farm virgin	grass	1.47	—
17	Peterson Farm wheat 15 yrs.	wheat	1.48	—1.18
18	Peterson Farm virgin	grass	2.66	—
19	Peterson Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	3.68	1.02
20	Partington Farm alfalfa 20 yrs.	alfalfa	4.15	3.18
21	Partington Farm alfalfa 17 yrs. wheat last three	wheat	3.79	2.82
22	Partington Farm wheat 20 yrs.	wheat	.53	— .44
23	Partington Farm virgin	grass	.97	—
24	Edwards Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	1.73	.86
25	Edwards Farm virgin	grass	.87	—
26	Edwards Farm wheat 27 yrs.	fallow	.52	— .35
27	Farrell Farm vegetable 35 yrs.	corn and beans	16.74	14.02
28	Farrell Farm alfalfa 35 yrs.	alfalfa	2.60	— .12
29	Farrell Farm virgin	grass	2.72	—
30	Farrell Farm wheat 35 yrs.	wheat	4.50	1.78
31	Farrell Farm wheat 25 yrs.	fallow	3.52	.80

reanalysed after they had been in the laboratory in an air-dry condition for several months, and the same relationship between virgin and cultivated was found to exist, differing only in that the quantity of nitric nitrogen produced was much lower than here reported. This being the case the differences here noted must be due to a difference in the bacterial flora, and not due to any slight difference of moisture which may have existed at the time of the first analysis.

The differences noted are brought out clearer in the summarized results given in Table VI.

Table VI.
Giving the average quantity of nitric nitrogen in milligrams produced by the various soils.

Cultivated	4.16
Virgin	2.09
Main crop grown was wheat	3.67
Main crop grown, alfalfa	2.37

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Crop when sampled, wheat	4.18
Crop when sampled, alfalfa	2.39
Crop when sampled, fallow	6.22

The cultivated soil produced twice the nitric nitrogen produced by the virgin soil. Even when the excessively high results which were abnormal in that the two soils had received manure, be excluded from the average the cultivated produced more than the virgin soil. The quantity produced in the alfalfa soil was much lower than that produced in either the cultivated or virgin soil. This explains to a certain extent the extremely small quantity of nitric nitrogen previously found to exist in alfalfa soil¹). The results here reported show the alfalfa and virgin soil to be very similar in nitrifying powers being only slightly higher in the alfalfa. With all of the above results there is noted a relationship between the extent to which a soil is tilled and in this way aeriated and the quantity of nitric nitrogen produced by that soil. And in this connection it would be very interesting to make a study of the nitric nitrogen found in soil and produced in the soil of the alfalfa disked and undisked. It seems quite possible that at least a part of the increase in yield which is found to follow the disking of the alfalfa land is due to this very fact. For it would not only increase ammonification and nitrification, but this increased aeriation would react beneficially upon both the symbiotic and non-symbiotic nitrogen fixing organisms of the soil.

The Nitrogen Fixing Powers of the Soil.

Two very interesting and important facts have been established for the soils of the so-called arid regions of America. These are that nitrogen in most of the soils is a limiting factor of crop production, and that even long continued cultivation has not appreciably decreased the nitrogen supply of these soils. It has long been an established fact that soils allowed to run wild do accumulate appreciable quantities of nitrogen and it is this supply that has been stored in the soil during countless ages that is being used by the agriculturist of today in the new agricultural districts of the world. About the middle of the eighties of last century, the careful work of Hellriegel and Wilfarth demonstrated one of the main ways in which this nitrogen could accumulate. This was followed by the work of Winogradsky, Beijerinck, Gerlach, Vogel, Lipman, and many other investigators until today we know many organisms which can render the atmospheric nitrogen of the air available to the plant.

In the soil which is allowed to "run wild" many of the losses of nitrogen which are common to the cultivated soil are absent so that in time the slowly accumulating nitrogen becomes sufficient to measure and we note a gain. In other words, the loss from the various factors has become less than the slow accumulations. Now it seems at least possible that we may have soils with a very low nitrogen content in which conditions are favorable for these nitrogen gathering organisms, and we may have the quantity gained by the soil exactly balancing or even greater than that which is lost to the soil under agricultural conditions. This being the case we would have a condition such as exists in many of the cultivated soils of the arid regions.

This investigation was therefore carried on to test in a degree this theory. The samples previously described were tested for their nitrogen fixing powers

---

¹) Stewart and Greaves, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 121.

as follows: Beakers covered with Petri dishes were sterilized and into these were weighed 100 gram portions of the soil to be tested, together with one and one-half grams of mannite. The soils were thoroughly mixed with a sterile spatula and sufficient sterile distilled water added to make the moisture content of the soil 18 per cent. The tumblers together with their contents were weighed and the moisture content made up every four days to 18 per cent.

The soils were incubated at 28° to 30° C. for eighteen days and the nitrogen determined by the Kjeldahl method as modified by Lipman and Sharp[1]).

At the end of eighteen days the samples were heated in an electric in-

Table VII.
Giving milligrams of N. fixed in 100 grams of soil to which 1½ grams of mannite was added.

No.	No. of determinations in average	Description of Soil	Crop when sampled	Milligrams of N. fixed	Excess in cultivated
1	4	Green Farm potatoes 23 yrs., oats 2 yrs. alfalfa 4 yrs.	alfalfa	19.6	17.2
2	7	Green Farm alfalfa 29 yrs.	alfalfa	8.4	6.0
3	4	Green Farm virgin	grass	2.4	
4	4	Green Farm wheat 26 yrs.	fallow	22.8	20,4
5	5	Riter Farm virgin	grass	10.8	
6	4	Riter Farm wheat 26 yrs.	wheat	11.9	1.1
7	4	Holmes Farm wheat 18 yrs. alfalfa last four years	alfalfa	5.6	5.6
8	4	Holmes Farm wheat 6 yrs. alfalfa 14 yrs. wheat 2 yrs.	wheat	9.10	9.10
9	4	Holmes Farm virgin	grass	0	
10	2	Holmes Farm wheat 22 yrs.	wheat	5.6	5.6
11	2	Greaves Farm virgin	grass sagebrush	4.2	
12		Greaves Farm alfalfa 28 yrs. wheat 3 yrs.	wheat	9.8	5.6
13	4	Miller Farm wheat 20 yrs.	fallow	14.0	10.36
14		Miller Farm virgin	grass and sagebrush	3.64	
15	4	Greaves Farm alfalfa 24 yrs.	alfalfa	24.08	11.20
16	4	Greaves Farm virgin	grass	12.88	
17	4	Peterson Farm wheat 15 yrs.	wheat	10.08	5.18
18	4	Peterson Farm virgin	grass	4.9	
19	4	Peterson Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	14.7	9.8
20	4	Partington Farm alfalfa 20 yrs.	alfalfa	11.2	—1.4
21	4	Partington Farm alfalfa 17 yrs. wheat last three	wheat	12.6	
22	4	Partington Farm wheat 20 yrs.	wheat	15.4	2.8
23	4	Partington Farm virgin	grass	12.6	
24	6	Edwards Farm alfalfa 26 yrs.	alfalfa	4.2	—1.4
25	6	Edwards Farm virgin	grass	5.6	
26	6	Edwards Farm wheat 27 yrs.	fallow	12.6	7.0
27	6	Farrell Farm vegetable 35 yrs.	corn and beans	51.8	38.92
28	6	Farrell Farm alfalfa 35 yrs.	alfalfa	16.1	3.22
29	6	Farrell Farm virgin	grass	12.88	
30	6	Farrell Farm wheat 35 yrs.	wheat	4.2	—8.68
31	4	Farrell Farm wheat 45 yrs.	fallow	16.10	3.22

---

[1]) Lipman and Sharp, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 35. 1913. p. 648.

cubator at 95° C. until dry, and then 20 grams of the soil accurately weighed into 500 cc. Kjeldahl digestion flasks, 35 cc. of concentrated sulfuric acid added and heated until frothing ceased. To each was then added 10 grams of potassium sulphate, one gram ferrous sulfate, and one half gram of copper sulfate. The mixture was heated until colorless, cooled, diluted with water, neutralized and distilled into n/10 sulfuric acid. The determinations were all made in duplicates and compared with sterile blanks, so that each reported result is the average of a number of closely agreeing determinations. The results are reported as milligrams of the element nitrogen which has been gained by 100 grams of the soil.

The results are given in Table VII.

The soils show a great variation in their nitrogen fixing powers, thus ranging all the way from 0 to 51.8 mgs. In the soil from the Green ranch the cultivated soils all show a high value, while in the case of the virgin it is very low. The Riter farm while showing a slight difference in favor of the cultivated soil gives a much higher fixation of nitrogen in the virgin than does the preceding. The soil from the Greaves farm while a much heavier soil than the preceding, shows relatively higher nitrogen fixing powers, a condition that may be due to the irrigation water applied annually to the soil. When one recalls the properties of the Azotobacter it seems remarkable to find so high a nitrogen fixing power as is observed in the Miller soil which is a heavy clay soil.

In all the samples analyzed it is remarkable to find only three in which the quantity of nitrogen fixed in the virgin soils exceeds that fixed in the cultivated. In two of these the difference existing in favor of the virgin soil is very small and it is very significant that the one in which there was a great difference is the soil in which Dr. Stewart found a large decrease in the nitrogen content of the surface soil due to cultivation. Practically all of the soils show high nitrogen fixing powers. Little could be ascribed to B. radicola as there is such a slight difference in favor of the alfalfa soils. Furthermore, most of these soils gave a good Azotobacter membrane on the Ashby media, and in many cases the membrane contained nearly pure culture of the Azotobacter.

The difference existing between the variously treated soils is summarized in Table VIII.

Table VIII.

Giving the average quantity of nitrogen in milligrams fixed in 100 grams of soil.

Cultivated	14.28
Virgin	6.99
Main crop grown was wheat	11.83
Main crop grown was alfalfa	12.24
Crop when sampled, wheat	9.84
Crop when sampled, alfalfa	12.01
Crop when sampled, fallow	22.81

We find over twice the quantity fixed in the cultivated that there was in the virgin soil, and a greater quantity in the alfalfa than in the wheat. The fallowed soil shows remarkable high nitrogen fixing powers. This is especially interesting when one remembers that the soils of this series which have the highest fixing powers are better supplied with nitrogen than are the others, a fact which tends to substantiate the laboratory finding of

McBeth[1]), that combined nitrogen stimulates in place of retards the nitrogen fixing powers of the Azotobacter.

The above are results obtained with soil when removed to the laboratory and put in under ideal conditions for nitrogen fixation, so one would not be justified in concluding that as great a difference would exist in field practice, but it does prove conclusively that there is a difference in the bacterial flora of the virgin and cultivated.

In order to get nearer field conditions a number of the above soils were incubated without mannite, the procedure being as follows: 100 gram portions of soil were weighed into covered tumblers and sufficient sterile distilled water added to make the moisture content of the soil 18 per cent. The tumbler together with its contents were weighed and the moisture content made up to 18 per cent weekly. They were thus incubated with out the addition of mannite or any other substance except distilled water.

The soils were incubated at 28° to 30° for six weeks and then the nitrogen content determined. All determinations were made in duplicates and compared with sterile blanks so that each reported result is the average of a number of closely agreeing determinations. The results thus obtained are given in Table IX.

Table IX.

Giving milligrams of nitrogen fixed in 100 grams of soil in six weeks.

No.	No. of determinations in average	Description	Crop when sampled	Milligrams of N. fixed	Excess in cultivated
1	4	Green Farm potatoes 23 yrs.	alfalfa	3.6	1.4
2	4	Green Farm alfalfa 29 yrs.	alfalfa	2.2	0
3	4	Green Farm virgin	grass	2.2	
4	4	Green Farm wheat 26 yrs.	fallow	16.8	14.6
5	4	Riter Farm virgin	grass	4.0	
6	4	Riter Farm wheat 26 yrs.	wheat	5.6	1.6
7	4	Holmes Farm wheat 6 yrs., alfalfa last four years	alfalfa	2.4	—.4
8	5	Holmes Farm wheat 6 yrs., alfalfa 14 yrs., wheat 2 yrs.	wheat	6.3	3.5
9	4	Holmes Farm virgin	grass	2.8	
10	3	Holmes Farm wheat 22 yrs.	wheat	4.2	1.4
11	5	Greaves Farm virgin	grass	1.4	
12	4	Greaves Farm alfalfa 28 yrs., wheat 3 yrs.	wheat	1.4	0
13	3	Miller Farm wheat 29 yrs.	fallow	9.10	4.48
14	6	Miller Farm virgin	grass	4.62	
15	3	Greaves Farm alfalfa 24 yrs.	alfalfa	4.48	4.48
16	4	Greaves Farm virgin	grass	0	

The results thus obtained were so similar to those obtained where mannite was added that it was thought unnecessary to continue it with more samples as the quantity of nitrogen is small, and it involved great care and considerable time in making the determinations. This much, however, seems to be well established by these results and that is the nitrogen fixing powers of the cultivated soils are greater than that of the virgin. In these determinations the average milligrams of nitrogen fixed per 100 grams of soil, without the addition of anything except sterile distilled water, was for the virgin 2.50 mg. and for the cultivated 5.61 mg. Thus showing that the cultivated soil had the power to fix over twice that fixed by the virgin. The temperature of the soil would be much lower under field conditions than under these laboratory tests. A great number of temperature determinations were made during the month of September on a soil under field conditions similar to the ones under examination. These results showed an average temperature of 14° C. with a minimum if 10° C. and a maximum of 17° C. But even at these temperatures appreciable quantities of nitrogen would be fixed as is shown by the work of Löhnis[1]). He inoculated 100 cc. of a 1 per cent mannite soil extract with 10 grams of soil and obtained the folowing fixation at the various temperatures:

---

[1]) McBeth, U. S. Dept. of Agric. Bur. of Plant Ind. Circ. 131. p. 20.

10°—12° C.	20°—22° C.	30°—32° C.
3.15 mgs.	4.55 mgs.	4.27 mgs. of nitrogen fixed.

During much of the year the moisture content of the soils would not be far from optimum for Krainsky[2]) found that nitrogen assimilation was greatest when the soil was but slightly moist. The soils of the arid districts would not become filled with water so aeration would be great compared with many of the soils of the humid districts. On the other hand some of the field conditions would be better for the fixation of nitrogen than are the laboratory conditions. In the field with the growing crop there would be the continual removal of the nitrogen as fixed which has been shown by Koch and Seydel[3]) to be so important. Taken all these facts into consideration, it seems practically certain that even under field conditions these soils would gain appreciable quantities of nitrogen and that this gain would be greater in the cultivated soil than in the virgin soil, for conditions of aeration, moisture and the like would be more nearly ideal for nitrogen fixation in the former than in the latter. It seems quite possible that the Azotobacter in the cultivated soils would have a better supply of carbon from which to obtain their energy than those in the virgin soil. This extra supply coming from the cellulose contained in the plant residues as McBeth[4]) has shown that the Azotobacter when grown in connection with the cellulose ferment can use cellulose as a source of energy. Furthermore, Kellerman[5]) and his coworkers have shown that many active cellulose ferments occur in these soils. The extra aeration which would occur in the cultivated soils would undoubtedly react beneficially upon the nitrogen fixing organisms[6]). Considering all these facts together with the increase noted in the nitrogen content of the surface foot of cultivated soils it seems very reasonable to conclude that the various microscopic organisms play no small part in this increase.

General Considerations.

There has been noted to exist very similar relationships between the various determinations. As a general rule the soil giving a high numerical count has also given comparatively high ammonifying, nitrifying and nitrogen fixing powers. Taking them individually there is often variation, but the similarity is much nearer in the average results. These are summarized in Table X. The per cent of nitrogen and humus given in the last two columns are those reported by Dr. Stewart[1]. They are the averages not only of most of the soils reported in this work, but of a number of other soils.

---

[1]) Löhnis Handbuch der landw. Bakt. 687.

[2]) Krainsky, Chem. Abs. 3. 1909. p. 2991.

[3]) Koch u. Seydel, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1911. p. 570.

[4]) McBeth, U. S. Dept. of Agric. Bur. of Plant Ind. Circ. 131. p. 25.

[5]) Kellermann, McBeth, Scales and Smith, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 39. 1913. p. 502.

[6]) Buhlert-Fickindey, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 16. 1906. p. 399.

Table X.
Giving average results obtained in the various determinations.

	Colonies (million)	Mg. of NH_3 formed	Mg. Nitric N formed	Mg. of N fixed	% total Nitrogen	% Humus
Cultivated	4.452	57.96	4.16	14.28	.2032	2.47
Virgin	2.270	43.88	2.09	6.99	.1984	2.45
Main crop grown wheat . .	4.840	52.94	4.00	11.83	.2055	2.67
Main crop grown, alfalfa . .	3.911	50.52	2.25	12.24	.2009	2.27
Crop when sampled, wheat .	5.322	55.05	4.18	9.44		
Crop when sampled alfalfa .	4.038	38.38	2.39	12.12		
Crop when sampled fallow .	3.575	83.42	6.22	22.88		

With the single exception of the ammonia produced these results show a nearly quantative relationship between the number of colonies, milligrams of nitric nitrogen formed and nitrogen fixed in the cultivated and virgin soils. The cultivated soil gave results practically twice as great as the virgin. There is also shown a relationship between the nitrogen fixing powers of the soils and the per cent total nitrogen found in the soil. The results prove conclusively that the bacterial flora of cultivated and virgin soils differ and that the bacterial activities are much greater in the former than in the latter. The results obtained with the alfalfa and wheat soil show the same variation between each, average results being higher in every case in the soil which has been growing wheat than that which has been growing alfalfa. With the single exception of the nitrogen fixing powers which are slightly greater in the alfalfa than in the wheat land. This is probably due to the B. radicola being present in the alfalfa soil in greater quantities than it is in the wheat soil and when given aneasily available supply of carbon it has fixed small quantities of nitrogen, while the number thus existing may not develop upon the agar plates. This supposition is born out when the results obtained upon nitrogen fixations without mannite be examined. Here the results are slightly higher in the wheat land than in the alfafla land. The differences noted when the average be taken for crop when sampled bespeak an accumulative influence of crop upon bacterial activity, but this is not as great as the seasonal influence of crops and especially the cultural methods used. There is seen to exist a very close relationship between the results reported and the methods of tilling the soil and it would seem that the methods being practiced to conserve the moisture of the soil increase the bacterial activities of the soil and in so doing increase the available supply of plant food in the soil. And furthermore, it seems very probable that at least part of the good resulting from summer fallow is due to the energetic activity of nitrogen fixing microscopic organisms in the soil[2]. It is not claimed that this is the only factor, or probably not the main factor in maintaining the nitrogen content of the surface foot of cultivated soils. It may be that the bringing of nitrogen from lower depth to the surface, as was so well proven by Dr. Stewart, is of greater moment than the activities of these microscopic organisms, but it must be admitted that the proof is strong that they play no small part in the maintenance of the nitrogen content of our arid cultivated soil. In these soils is an adequate supply of phosphorus and the other elements required for the vigorous activity of the Azotobacter. Furthermore, they contain an abundance of calcium carbonate which Ashby[1]) has shown to be so essencial for their life activities.

---

[1] Stewart, Utah Exper. Stat. Bull. 109.

[2] Heinze, Chem. Abst. 5. p. 1148.

Summary.

The results reported in this work represent the analyses of the soils from nine different farms situated at various places within a radius of forty-five miles, and they vary greatly in physical composition grading all the way from a heavy clay to a fine sand. The chemical composition of the soils are more nearly similar. They were all provided with an abundance of all the essential elements of plant food with the exception of nitrogen. This in most cases was low. They all contained comparatively large quantities of calcium carbonate.

The number of organisms found in cultivated soil was about twice that found in virgin soil, and the number was higher in wheat land than in alfalfa land.

The nitric nitrogen found in cultivated soil under the experimental conditions was twice that found in the cultivated. The nitrogen fixed in the cultivated soil was twice that fixed by the virgin, and this same relationship was found to hold when the soils were incubated without the addition of anything except distilled water to the soils. The soils comparatively rich in combined nitrogen fixed more nitrogen than those poorer in organic nitrogen. This may be due to the excess of organic carbon found in the former which served as a source of energy to the nitrogen fixing organisms. Much less nitric nitrogen was produced in the alfalfa soil than in wheat soil, but the nitrogen fixed was slightly greater in the former than in the latter.

The working of the soil increases the bacterial activities of the soil and thus increases the available plant food of the soil. It is likely that a part of the increase in crops which results from summer fallowing, disking and the like is due to increased available plant food of the soil brought about by increased bacterial activities.

The various microscopic nitrogen fixing organisms of the soil play an as yet unmeasured, but appreciable part in the maintenance of the nitrogen content of the cultivated arid soils. The abundance of Azotobacter present in the soil and the ideal condition prevailing for their activity make it appear that it is this species that play the greatest part in fixing the nitrogen.

---

[1]) **Ashby**, Journ. Agr. Sci. 2. 1907. p. 35.

Nachdruck verboten.

The bacterial Content of Coal.

By **Harold Schroeder,** Manchester.

With 4 Figures.

E. Galle (1) describes a series of experiments on the bacterial content of coal and finds the bacteria isolated capable of causing fermentation of the coal with production of gas largely composed of Methane and Carbon-dioxide.

As the occurrence of Methane is such an element of danger in the coal industry it seemed highly desirable that this work of Galles should be repeated in extenso and some explanation of the presence of the bacteria if possible given.

The work to be described is divided into the following sections:

1. a bacteriological analysis of coal.
2. an investigation of the coal fermenting properties of the isolated bacteria.
3. an explanation of the presence of the bacteria.
4. a demonstration of the absorbent action of coal.
5. conclusions.

Part. 1.

A bacteriological analysis of coal.

Details of the manipulative methods employed by Galle are somewhat lacking. Obviously, if it be desired to demonstrate the presence of bacteria in any particular substance it is necessary that all possible chances of extraneous contamination during the taking of the sample and in the interim before the examination is proceeded with should be foreseen and guarded against otherwise development of life in the culture medium will not be conclusive evideece of its original presence in the sample. Galle does not state what, if any, were the precautions adopted.

The first sample came from the University cellar. It and the second specimen, referred to later as Sample I and II respectively, came originally from the same mine.

Coal picked up casually by the wayside and examined forthwith without special treatment cannot, from a bacteriological point of view, be held as identical in composition with the coal in situ in the original face as it is shown later in this paper that coal will readily abstract organisms from a liquid with which it comes in contact.

In the course of its transfer from the mine to the cellar and during its sojourn there Sample I had doubtless been exposed to many sources of contamination but a large piece was used weighing about five kilos and by the method given below only a sample from the heart of this piece was finally used consequently all possible chance of extraneous contamination was prevented.

The bacterial content of this final sample was due to two causes

1. possible normal constituents.
2. bacterial contamination in the life history of the coal after leaving the seam.

In this case, owing to the method of sampling 1. is likely to prevail, as the influence of 2. will be greatly diminished by the thickness of the original piece. Under 1 are included bacteria which were present in the coal in situ in the original face.

The apparatus shown in the figure was used in the operation of taking a sample uncontaminated by adventitious organisms. It was sterilised en bloc for three hours at 160° C in a Hearson electric sterilisor.

The coal (Sample 1) being put under the bell jar was split along the line of cleavage on both sides; the two fragments were immediately removed. A piece was then broken off each end across the line of cleavage and also removed. The fragment then remaining had six sides, four of which were freshly exposed and twoo of which were original. These were broken away by use of the striker and the final result was a piece of coal measuring approximately 5 cms by 2 cms by 2 cms which had not by the processes described been subjected to any influence which would tend either to increase or diminish the bacterial population.

This final sample was pulverised in the sterile mortar shown in the figure, being yet under the protection of the bell-jar. The powder was introduced into sterile test-tubes, for which operation the bell jar was slightly tilted to one side in order to accomodate the hands. The coal was thous in a sterile atmosphere from start to finish.

About 5 gm of the dust was inoculated into sterile peptone broth and the tubes incubated, some aerobically and some anaerobically. There was no difference in the organisms obtained by the two methods.

At 20° C growth became visible in a week. Insomuch as the organisms isolated from these tubes developed vigorously in twenty four hours in the same medium this pause of a week requires explanation.

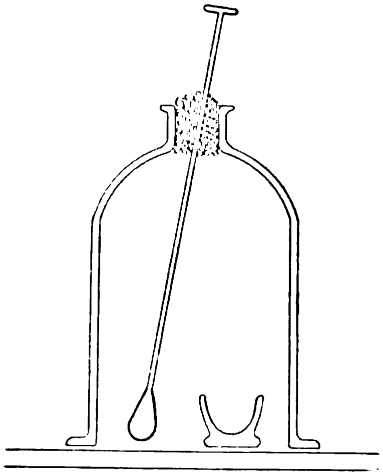


Fig. 1.

Even in the form of dust coal does not readily absorb water so a certain interval must elapse before the grains of coal were permeated by the broth. Yet another factor would be at work. It is shown later in this paper that coal exerts an absorbent action on complex molecular structures, consequently the peptone and meat-extract would be retained by the outside of the granule leaving very much weakened medium to pass on to the interior.

The absence of bacteria from the outside of the coal particles is presumptive evidence of the aseptic correctness of the methods used in sampling.

Growth developed in all the tubes inoculated and from these gelatine peptone broth plates were prepared in the usual way. The colonies were subcultured on the same media and pure cultures of three organisms named respectively S 1, S 2 and S 3. Their cultural characteristics are described in the appendix to this section.

Nitrifiying bacteria were tested for but with negative results.

Sample II came direct from the mine and was taken by the author himself. In order for this sample to be of scientific value it was essential that the source should be a freshly opened up face which had not been exposed to contamination, human or otherwise, that during the sampling, access of adventitious organisms should be prevented and that prior to analysis it should be kept in a sterile atmosphere.

The Clifton and Kersley Colliery Company of Lancashire, England, kindly gave facilities for visits to their mines.

The face used lay 2700 metres from the ground level and was quite new. Its situation was in a bye-pass away out of the direct ventilation current and had moreover the protection of a canvas soreen.

With a metal instrument a portion of the surface was easily prised away. From the cavity thus made a piece of the inner coal was loosened with a fresh instrument and the removed with sterile tongs. It was immediately deposited in a sterile bottle the neck of which was greased with a lubricant composed of powdered Mercuric Chloride rubbed up in Vaseline.

This mine coal (Sample II) was worked up the same day as taken, in an identical manner to Sample I. Although in this case not really essential the operation of prising away the outer layer was gone through.

That a week elapsed before growth appeared in the inoculated peptone broth tubes was again observed. No difference could be detected between tubes incubated aerobically and anaerobically.

After plating out, the following organisms were obtained in pure culture, S 4, S 5, S 6. No nitrifying bacteria were found.

Galles results are supported by the above experiments. In view of the precautions taken it does not seem likely that the bacteria found could have been introduced during anyone of the manipulations involved.

Morphological and cultural characteristics of the bacteria isolated.

S 1. An extrememly motile Gram-non sporing cocco-bacillus 0.9 μ by 0.8 μ. It occurs singly, in chains containing up to six individuals and sometimes in packets of four but such only on solid media. Growth at 37° C is more vigorous and rapid than at 20° C.

Peptone broth. Fine silky colourless growth which produces turbidity in twenty four hours. Although the growth rapidly settles after shaking the liquid never becomes clear.

Gelatine peptone broth colonies are circular and usually about a millimetre in diameter after twenty four hours- non-granular with a yellowish green edge and are brown by transmitted light.

Gelatine peptone broth streak. Very light yellow by reflected light- the colour does not deepen with the age of the culture. It is granular and moist with ragged edges raised above the medium. Spreads at top and bottom where the growth is veined like a leaf. After three weeks the growth becomes less moist and can be separated from the medium in a thin water.

Gelatine peptone stab, growth to bottom of stab granular whitish-yellow growth on top.

Agar peptone broth. Thin spreading moist colourless non-granular growth the edges show a greenish yellow fluorescence by reflected light. Potato-Plentiful moist creamy translucent faint yellow growth. Glucose bile salt neutral red. Production of acid and gas in twenty four hours.

Lactose bile salt neutral red acid and gas in twenty four hours.

S 2. A very motile non-liquefying Gram-nonsporing coccus of diameter 0.6—0.7 μ. It always occurs singly even on solid media. Growth at 37° C. is more rapid and vigorous than at 20° C. It is a facultative anaerobe.

Peptone broth. always turbid due to silky colourless growth.

Gelatine peptone colonies, circular, convex, translucent, well defined edge.

Gelatine peptone streak at first transparent and granular, non spreading. After three weeks has become grey white, flaky, and opaque with markedly raised edges.

Agar peptone streak spreading moist transparent non granular showing a slight greenish flourescence.

Milk. No action.

Potato very moist and therefore thin, faintly yellowish growth.

Glucose bile salt neutral red, acid and gas.

Lactose bile salt neutral red. Acid and gas.

S 3. A very motile Gram-non liquefying sporing bacillus 4.5 μ in length, 2—2.5 μ in breadth. It always occurs singly. This organism is very sensitive to slight changes in the alkalinity of the medium. No growth is obtained on even faintly acid media. Spores, .8μ by 3 μ. Peptone broth remains clear with a graunlar colourless precipitate Gelatine peptone streak transparent colourless granular growth raised at edges. It is non spreading and shows many little lumps.

Gelatine peptone stab whitish growth in stab, pink growth on surfae Agar peptone colonies. Circular moist shiny markedly plano convex with a strong pink coloration on surface. The base of the colonies is white.

Agar peptone streak. Moist thin pink growth with numerous off-shoots that resemble pseudopodia.

Milk, no action.

Potato, salmon pink dry shiny nonspreading growth.

Glucose and Lactose bile salt neutral red no acid or gas.

S 4. Was identified as B. Welchii and gave all the reactions for this organism.

S 5. A small feebly motile bacillus .8 μ long, by .3 μ broad which progresses with a twisting motion. It spores in liquid media and liquefies Gelatine slowly. Peptone broth. Turbid in twenty four hours. The growth is composed of small fethery flocks which settle leaving the supernatant liquid clear.

Gelatine peptone, streak. Is a moist granular non spreading growth after a week it becomes raised much more granular and opaque. The liquefaction is slow and confined to the substrate which is then of a dull slate colour.

Gelatine peptone stab. Grows to bottom of stab with many side off shoots the liquefaction takes place at the top of the tube. Agar pepton, moist thin greyish well spreading growth.

Milk, no action.

Potato, growth is yellow moist oreamy and shiny.

Glucose and Lactose bile salt neutral red no acid or gas.

S 6. A non motile liquefying Gram-sporing bacillus, .5 μ long by .3 μ wide with circular spores. 3 μ in diameter. The ends are squarely rounded.

Peptone broth, growth in twenty four hours. The liquid remains clear with a flocculent precipitate.

Gelatine peptone is rapidly liquefied becoming a very refractile brownish coloured liquid containing a glutinous stringy light yellow bacterial growth.

Agar peptone colonies, small circular translucent greyish. X 120 are brownish and uniformly made up of entwined tendrils.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Agar peptone streak. Very slow growth which is very much curved across the line of the needle, is thin flat, moist and veined parellel with streak.

Gelatine peptone stab. Grows to bottom of stab. Liquefies in a cylindrical fashion in four to five days.

Milk, no action.

Potato, no visible growth.

Glucose and Lactose bile salt broth neutral red. No acid or gas.

Part 2.

An investigation of the coal fermenting properties of the isolated bacteria.

Unfortunately Galle does not specify what variety of coal he employed in his fermentation experiments. Anything from lignite to anthracite may have been used.

Relying on the statements of Meyer (2) Galle assumed that his coal would be gas free after five sterilisations at 105° C although used in pieces as large as cherries.

Although not containing an excessive amount of gas both samples I and II in cherry sized pieces continued to give off gas when treated according to Meyers directions. It is thus not permissible to apply Meyers results to any coal other than the variely he used. As Galle did not test his coal it cannot be assumed that this was gas free at the end of the treatment.

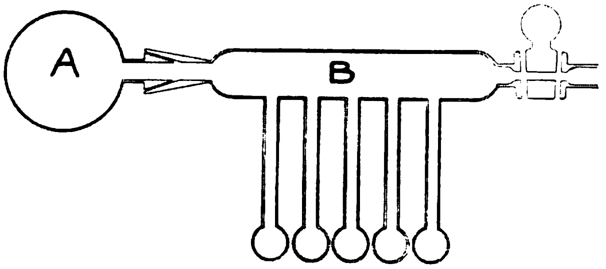


Fig. 2.

In order to obtain sterile gas free coal the apparatus shown in Fig. 2 was used.

In the bulb A powdered coal was sterilised for three days in succession for twenty minutes at 100° C. B was sterilised at 160° C. for three hours. Whilst yet in the sterilisor the ground glass joint of A was smeared with the Mercuric Chloride Vaseline lubricant and connected to B without loss of time.

The bulb A was maintained in an air oven at 110° C which had a slit cut down one side in order to pass the connecting tube between A and B.

The apparatus was joined up to a pump and manometer. Every four hours the pump was shut off and the rate of fall of pressure inside the apparatus noted. Even after twelve hours heating in vacuo, gas continued to be given off at a measurable rate. It was not until the end of the third day that the pressure remained constant at the barometric height over a period of two hours.

After closing the tap the apparatus was disconnected from a the pump. The coal, dry sterile and gas free was shaken from A into B and thence into the small buls which were half filled. After shaking the connecting tubes free of dust they were sealed off with a small flame.

Each bulb contained dry sterile gas free coal in vacuo. In order to show that the coal was sterile and that the succeeding operation did not tend towards contamination a coal bulb was inoculated into peptone broth. No growth appeared in it nor on a plate inoculated from it.

Galle did not apparently attempt to free his peptone broth from gas or from Glucose.

Peptone broth made in the usual way was boiled in vacuo for a quarter of an hour and then run into test tubes containing a Durhams tube. After sterilisation these were completely filled with liquid by pumping out all air. That Glucose or any substance capable of fermentation by the organisms used was absent is shown by the negative results in Series II below.

The following series of tubes was put up:

1. Peptone broth alone.
2. Peptone broth tubes inoculated respectively with S 1, S 2, S 3, S 4, S 5, S 6, Bac. subtilis and sewage.
3. Similarly inoculated tubes but containing sterile gas free coal.
4. Peptone broth and sterile gas free coal.

A complete series of checks was thus provided.

After incubating for a week not one of the tubes showed any evolution of gas except one of the tubes containing coal and peptone broth alone. This tube showed two minute bubbles of gas which did not increase in volume on incubation and had probably been introduced by a too vigorous shaking of the tube. The broth had remained sterile.

Growth took place in all the inoculated tubes but not one of them showed any signs of gas even after a fortnight's incubation, not even Bac. subtilis had any fermentative action on the coal. This is directly opposed to the result obtained by Galle with this organism. It has been already suggested that the coal used by Galle was not completely free from gas. It was possible by using coal which although sterile was not gas free, to obtain results similar to Galles without the presence of any organism whatsoever.

A triple sterilisation at 100° C for twenty minutes was quite sufficient to sterilise the coal used in these experiments but not sufficient to remove all the gas.

When such coal was placed in sterile peptone broth gas was evolved after twenty four hours although no organism had developed after a week.

This lag period was noticed by Galle and is usually held to be significant of bacterial fermentations and due to the time required for the bacterial content to rise to the necessary concentration for attack on the substance present. But when it is shown that such a lag occurs without the presence of an organism some other explanation, is necessary.

When the gas-containing coal is put into a liquid the occluded gas entrapped between the particles will begin to be exchanged for the liquid. Owing to the small aggregations of gas molecules supersaturation effects will supervene and prevent the evolution of gas till they reach a certain limit.

There are therefore no reasons for assuming that the gas evolved in Galles experiments was due to any other action the that of a liquid (the peptone broth) on the occluded gas in the coal.

The gas evolved in these experiments of Galles varied much in composition with the organism used. It is possible that these variations are due to the different food requirements of the various bacteria under the anaerobic conditions prevailing during the experiments.

The modern view of the constitution of coal is based on the assumption of two main constituents, celluloses and resins.

Supposing that one of these is really capable of undergoing bacterial fermentation it is possible to argue the second constituent as in some way exercising an inhibitory effect, thus explaining the negative results obtained by the author, which effect would not be exerted when the constituents were separately tested.

Clark and Wheeler (3) using Pyridine found that in such a solvent the resins were soluble and the celluloses insoluble.

About 100 grams of the same coal as before were extracted with Pyridine for a fortnight in an electrically heated Soxhlet at the end of which time the issuing liquid was almost colourless.

The insoluble residue was drained on a porous plate and the excess Pyridine evaporated off in vacuo at 37° C. After continuous treatment with warm water till the waste liquid no longer smelt of Pyridine the mass was kept over Sulphuric Acid until required for use.

The solution of the resins was evaporated in vacuo at 50° C until free from most of the Pyridine. Having then become solid it was treated like the celluloses.

All these operations were conducted in as sterile a manner as possible. Both the constituents were shown to be gas free before use. They were tested separately with the same organisms and it the same manner as the coalo.

No gas was evolved although bacteria developed in all the inoculated tubes.

In view of the preceding experiments which tend to show that coal is not susceptible to bacterial fermentation, Galles theory that such fermentations occurring in the coal seams cause a rise of temperature which then sets in action a catalytic effect between the coal dust and the air resulting in a muchly increased heating effect leading eventually to Gob-fires cannot be said to be supported by unshakable experimental evidence.

It seems unlikely that the Methane present in mines is the product of recent bacterial action and consequently it is not logical to assume that Gob-fires, the origin of which is most probably connected with the evolution of Methane, are the result of bacterial action. The origin of such fires must be looked for by the chemist not the bacteriologist.

Part 3.

Explanation of the presence of the bacteria.

It is a known fact that seeds over five thousands years old are capable of germinations when placed under suitable conditions, consequently it is not possible to dismiss lightly the hypothesis that the bacteria found in coal are direct descendants of those present during the formation of the deposits.

This view necessarilly postulates the occurence of certain bacteria as normal indigent constituents of coal of which at least one would be found in every sample of coal, from the same mine, examined. Coal, according to the modern theory was originally formed by the action of bacteria. Therefore the bacteria which would remain in the coal as normal constituents would be those which were playing a part in the coal formation, consequently, assuming the truth of the above hypothesis, it is extremely likely that even if samples of coal from mines hundreds of miles apart are compared a certain similarity in the bacterial content would be observed.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Experimental evidence is all against this view. The cultural characteristics of the bacteria isolated from the samples of coal whose examination has been detailed do not reveal any similarities amongst themselves and cannot in any way be compared with the organisms isolated by Galle. Moreover what is known of the resistant powers of bacteria is all opposed to the conclusions derived from this hypothesis. It will be observed that the morphological characteristics of the isolated bacteria do not show any similarities. Whilst several spore S 1 and S 2 do not. The occurence of non-sporing organisms in the coal casts suspicion on the hypothesis that coal can possibly have a normal bacterial population. Such bacteria as are found will occur as the result of some outside influence and may vary possibly, in nature and degree from place to place in the same seam.

The most likely source of the organisms is water. B. Namylowski (4) describing the occurence of bacteria in salt-workings considers that the source of contamination may be infiltration from subterranean streams.

On examining the mine from which the samples were examined it was found that at one point water was trickling down the face at the 2700 metre level (from which Sample II was obtained).

The first 500 metres of the mine are composed of water-bearing strata. A sample of the water from this strata was collected and analysed and the results compared with the analyses of the water from the 2700 metre level.

The mine water contained B. Welchii which the surface water did not. Obviously it was not to the surface water alone that the mine water was due, unless the hypothesis that coal contains this well known non-resistant organism as a normal constituent be accepted. Even then, experiments given later show that water does not easily remove bacteria from coal.

The chemical analyses are as follows in parts per 100.000:

	Surface water	Mine water
N as F and S . . .	0.005	3.5
N as Alb.	0.112	0.06
Chlorine	111.1	5612
Total Solids	227	9606
Oxidised Nitrogen .	nil.	2.7
Temp. Hardness . .	24.8	1.5
Perm. Hardness . .	247.6	550.0

The presence of nitrates in the water and the absence of any nitrifying bacteria in the coal and the water may be taken as showing that the sewage had at one time been exposed to conditions suitable for nitrification, in other words had most likely been formed elsewhere than in the mine. The low amount of Albuminoid Ammonia, checked by the low absorption of acid Permaeganate, may be put down to the absorptive effect which coal lexercises.

This mine is situated in the heart of the Lancashire industrial district. The ground is rising towards the mountains of the North and with large towns set close one against the other an infiltration of sewage into the sub-soil of the Southern districts is not remarkable.

This sewage is probably diluted by the water from the water bearing stratammediately above the mine.

The bacterial population of coal is therefore due to arbitrary and fluctuating circumstances dependent not upon the age nor the mode of formation of the coal seams but entirely upon its situation in regard to external conditions. Its bacterial content may accordingly be zero in certain mines.

Part 4.

The absorptive action of coal.

During the proceeding work many examples of the effects produced by such an action came to light.

In the early stages of sewage purification it was discovered that coal had a curious power of absorption when placed on filters and so some experiments on the subject would serve to confirm these observations.

The same variety of coal as before was used broken up into pieces with a surface of about one and a half square centimetres: these were used to pack the inner tubes of the apparatus shown in the figure.

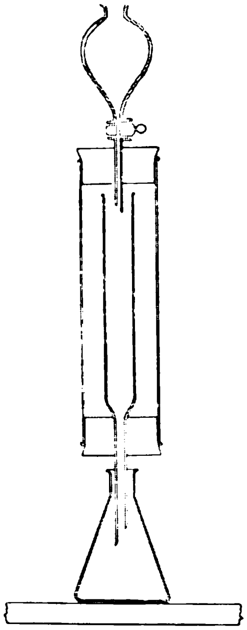


Fig. 3.

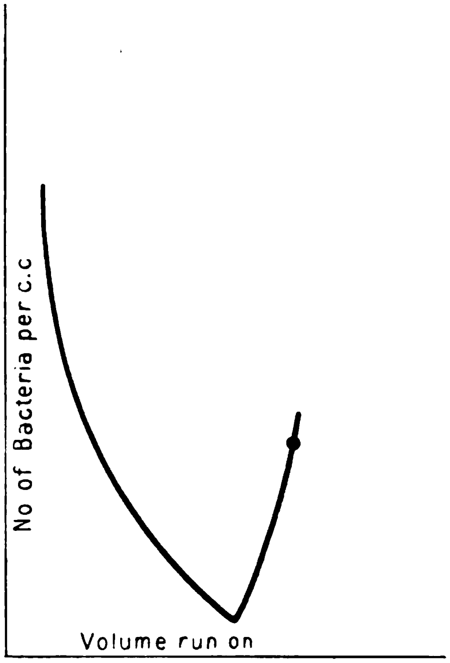


Fig. 4.

The outer tubes served as a protection against floating organisms.

Sterile water was run over the filter and plated out on G. P. B. but no organism could be detected in the effluent.

A solution of Sodium Chloride was run over and the issuing liquid analysed. The concentration of Sodium Chloride did not diminish.

After re-washing the filter a pure culture of an organism (B. coli) was run on at the rate of one cc. per minute. The effluent was collected in sterile flasks in portions of 10 ccs. This volume was made up to one hundred ccs. with sterile water and 1 cc. of this dilution plated out on G. P. B. The colonies were counted with a hand lens after two days.

It was found that after 50 ccs. had run on that the coal became tired and lost its power of absorption. It was rested for nine days and a similar series of experiments performed. It was not until 90 ccs. had been run on that the absorbent action ceased.

The first portion of effluent in both series showed no diminution in the number of bacteria. This points to primary absorption of the high molecular complexes, such as peptone which then act as a filter for the bacteria.

This is on a par with the formation of the film on a sand filter from the impurities in the water passing over.

When sterile water was run on to the filter, bacteria were easily detected in the effluent but only when tested for within a few hours of the attaining of the tired point. On resting for a few days sterile water did not remove any bacteria but on powdering up a piece of the coal and inoculating the gust into Lactose broth this was fermented with the production of acid and das showing that the B. coli had reached the interior of the coal.

Part 5.

Conclusions.

1. Galles work has been repeated and his assertions of the presence of organisms in coal substantiated. The coal has been sampled with all possible precautions to ensure sterility of manipulation.
2. It is shown that coal in pieces as large as cherries cannot be freed from gas by the method of Meyer and upon which Galle relied. The consequent supposition that Galle was using coal not freed from gas receives support from experiments with coal treated by Meyers method which gave off gas in peptone broth in the of any organism whatsoever.
3. The bacteria isolated from coal had no fermentative action resulting in the production of gas when grown in peptone broth in the presence of coal demonstrated to be gas free. An organism reported by Galle to produce gas gave negative results when tested with gas free coal. The effect of these negative results on the origin of gob fires is discussed.
4. The presence of the bacteria is shown to be probably due to the infiltration of sewage into the coal seam.
5. The absorptive action of coal on complex molecules has been demonstrated.

The author wishes to thank Dr. Gilbert Fowler F. I. C., for much valuable assistance and advice in this investigation.

The Frankland Laboratory. The University of Manchester.

References.

1. Galle, E., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. 1910/1911. p. 461—473.
2. Meyer, Journ. f. prakt. Chem. Bd. 5, 6.
3. Clark and Wheeler, Journ. Chem. Soc. Sept. 1913.
4. Namylowski, B., Bull. Acad. Sci. Cracovie. 1913. p. 88—104.

Originalberichte über Kongresse, Versammlungen etc.

Vereinigung für angewandte Botanik, Tagung in Berlin, am 7.—8. Oktober 1913.

Nachdruck verboten.

Über die Verwandtschaftsverhältnisse der Leguminosen-Wurzelbakterien.

Von Dr. **Josef Simon.**[1])

Entsprechend dem hohen wissenschaftlichen Interesse und der großen praktischen Bedeutung der Frage sind über die Verwandtschaftsverhältnisse der Leguminosen-Wurzelbakterien von verschiedenen Seiten Untersuchungen ausgeführt worden. Zum Teil auf kulturellem Wege, dann durch morphologische Studien über die Erreger der bekannten Wurzelanschwellungen, in neuerer Zeit auch durch Anwendung einer serologischen Methode, des sog. Agglutinationsverfahren, hat man Klarheit über die verwandtschaftlichen Beziehungen der genannten Kleinwesen angestrebt. Offensichtliche Unstimmigkeiten in den Untersuchungsresultaten und weit auseinandergehende Anschauungen, welche teils Arteinheit, teils Artverschiedenheit annehmen[2]), veranlaßten Verf., der Frage durch eingehende Untersuchungen näherzutreten. Dieselben erstreckten sich in der Hauptsache auf die Kultur der betreffenden Leguminosenarten in sterilen stickstoffarmen Medien und Impfung derselben mit Reinkulturen von, den Wurzelknöllchen der verschiedenen Hülsenfrüchte entstammenden Bakterienformen, also auf Pflanzenversuche. Nach der morphologischen Seite hin konnte in den Gestaltsverhältnissen der Bakterien, auch insoweit dieselben von der Art und der Natur des künstlichen Kulturmediums und der Kulturpflanze selbst beeinflußt werden, im Gegensatz zu **Maassen** und **Müller**, eine sichere Handhabe zur Trennung der Knöllchenbakterien in verschiedene, nach dieser Seite scharf charakterisierte konstante Arten nicht gefunden werden. Hingegen gaben serologische Untersuchungsmethoden zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse ein besseres Hilfsmittel an die Hand.

Die Agglutinationsmethode wurde zuerst von **Zipfel** angewendet[3]); allerdings wurden nur die Bakterien von **Phaseolus vulgaris** als Antigen gegenüber den Sera der Bakterien von **Pisum sativum**, **Vicia Faba** und **Trifolium pratense** verwendet und dabei gefunden, daß „die aus Erbsen- und Bohnenknöllchen gezüchteten Organismen identische Bakterienformen darstellen und von denen der Klee- und Pferdebohnenknöllchen zu trennen sind.“ Dies Ergebnis stand (von **Trifolium pratense** abgesehen) allerdings in scharfem Widerspruch zu den von uns und von anderer Seite bei Pflanzen-Impfversuchen erhaltenen Resultaten, nach denen die Bakterien von Phaseolus vulgaris und Pisum sativum für die gegenteilige Pflanze nicht infektiös sind, während die Bakterien von Pisum sativum und Vicia Faba sich sehr nahe stehen. Da die von Zipfel ausgeführten Versuche nicht mit den von uns s. Z. gelieferten Reinkulturen, sondern mit selbst aus Knöllchen gezüchteten Organismen angestellt wurden, erschien mir eine Nachprüfung mit unseren Kulturen, welche bezüglich ihrer Wirksamkeit und Reinheit durch Plattenguß und Infektionsversuche geprüft waren, umsomehr angezeigt, als das Zipfelsche Antigen Phaseolus vulgaris nicht gegenüber dem artgleichen Serum geprüft und seine Reinheit nicht erwiesen war. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die Gewinnnung absoluter Reinkulturen (von einem Individuum ausgehend) bei den Leguminosen-Wurzelbakterien auf viel größere Schwierigkeiten stößt, als man gemeinhin annimmt, indem die genannten Bakterien infolge Schleimbildung ungemein zäh mit Fremdbakterien, insbesondere aber mit artverwandten Keimen zusammenhaften, sodaß die gewonnenen Kulturen nur zu oft unrein sind.

---

[1]) Die nachfolgenden Ausführungen stellen gleichzeitig ein Referat dar über einen vom Verf. in Berlin gehaltenen Vortrag und über eine im Sommer 1913 erschienene Dissertation von Dr. **Krüger** „Beiträge zur Artenfrage der Knöllchenbakterien einiger Leguminosen“. Die letztgenannten Untersuchungen wurden auf Veranlassung und unter Mitwirkung des Verf. im Hygienischen Institut der Tierärztlichen Hochschule zu Dresden ausgeführt; dem Direktor desselben, Herrn Prof. Dr. **Klimmer**, sei auch an dieser Stelle für das freundliche Entgegenkommen verbindlichst gedankt.

[2]) Die einschlägige Literatur wird in dem Abdruck meines Vortrages eingehender gewürdigt; es erübrigt sich deshalb, hier näher darauf einzugehen, zumal dieselbe im Original oder als Referat fast vollständig in diesem Centralbl. vorhanden ist. (s. auch **Löhnis**, Handbuch).

[3]) s. dieses Centralbl. Bd. 32. p. 97.

In der umstehenden Tabelle sind zunächst die Resultate der während einer Reihe von Jahren ausgeführten Pflanzenversuche zusammengestellt: Die Verwandtschaftsverhältnisse der geprüften Bakterienformen kommen hier in ungemein klarer Gruppenbildung zum Ausdruck, welcher kaum etwas hinzuzufügen ist. Die isolierte Stellung der Bakterien von Phaseolus vulgaris steht allerdings im Gegensatz zu der Nobbe & Hiltner gelungenen Überführung von Erbsenbakterien in Bohnenbakterien und umgekehrt[1]). Hierzu äußerte Alfred Fischer: „Statt einer Umzüchtung könnte nur eine Selektion vorliegen, etwa derart, daß die ursprünglichen Erbsenbakterien ein Gemisch fein abgestufter Rassen schon enthielten, aus dem im weiteren Versuch eine Auswahl getroffen wurde“[2]). Inwieweit diese Ansicht Berechtigung hat, lasse ich dahingestellt, muß aber darauf hinweisen, daß wir uns in Tharandt während mehrerer Jahre vergebens bemüht haben, die erwähnte Überführung wieder zu erzielen.

Daß die Untersuchungen von Maassen & Müller mit der aus unseren Vegetationsversuchen resultierenden Gruppierung der Knöllchenbakterien übereinstimmen, zeigten bereits die früheren beiderseitigen Veröffentlichungen[3]). Wenn aber die genannten Autoren doch dem Pflanzenversuch zur Klärung der Artfrage geringeren Wert beimessen und andere Momente, wie Wachstum auf verschiedenen Nährböden, Art der Bakteroidenbildung usw. als von größerer Bedeutung erachten, so kann ich dem nicht zupflichten. Denn gerade diese Momente bilden recht variable Größen, während die spezifische Natur der Wirtspflanze oder einer Gruppe von Hülsenfrüchten ja gerade jenes Moment darstellt, welches die Art der Anpassung bedingt, welches der angepaßten Bakterienform den Stempel ihrer Eigenart aufdrückt und sie zur Konstanz heranzieht. Die trennenden Unterschiede sind denn auch weniger morphologischer als vielmehr physiologischer Natur, und gerade deshalb wohnt auch der Serum-Diagnostik ein hoher, wenn auch keineswegs ausschlaggebender Wert

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. p. 449.

[2]) Vorlesungen über Bakterien. 1903.

[3]) Maassen u. Müller, Mitt. a. d. biolog. Anst. f. Land- u. Forstwirtschaft 1907.

Simon, Vortrag i. d. Ver. d. Vertreter f. angew. Bot. 1907.

Ergebnisse von Pflanzen-Impfversuchen mit

(+ bedeutet positiven Impferfolg mit Knöllchenbildung,

	Bakterienart:	I. Genisteen				II. Trifolieen							
	Geimpfte Pflanzen:	1. Lup. ang.	2. Lup. lut.	3. Lup. per.	4. Lab. vulg.	5. Trif. prat.	6. Trif. inc.	7. Trif. hyb.	8. Trif. rep.	9. Med. sat.	10. Med. lup.	11. Mel. alb.	12. Trig. F. gr.
I. Genisteen	1. Lupinus angustifolius . .	+	+			—				—			
	2. „ luteus	+	+	+	—	—	—						
	3. „ perennis	+	+	+									
	4. Laburnum vulgare												
II. Trifolieen	5. Trifolium pratense	—	—	—		+	+	+	+	—	—	—	—
	6. „ incarnatum. . .		—		—	+	+	+	+	—	—		
	7. „ hybridum . . .					+	+	+	+	—	—		
	8. „ repens					+	+	+	+	—	—		
	9. Medicago sativa					—	—	—	—	+	+	+	+
	10. „ lupulina					—	—			+	+	+	+
	11. Melilotus albus.									+	+	+	+
	12. Trigonella Foenum graec. .									+	+	+	+
III. Loteen	13. Anthyllis vulneraria . . .												
	14. Lotus uliginosus												
	15. „ corniculatus		—		—		—						
	16. Tetragonolobus purpureus												
IV. Galegeen	17. Robinia pseudacacia . . .		—		—		—						
V. Hedysareen	18. Ornithopus sativus	+	+	+	—	—	—						
	19. Onobrychis sativa	—	—										
	20. Lespedeza striata	—											
	21. Arachis hypogaea	—											
VI. Vicieen	22. Pisum sativum		—			—	—			—	—		
	23. „ arvense					—					—		
	24. Vicia sativa		—			—	—			—	—		
	25. „ villosa		—			—					—		
	26. „ Faba												
	27. Lathyrus odoratus												
	28. „ silvestris												
	29. Cicer arietinum												
VII. Phaseoleen	30. Phaseolus vulgaris		—										
	31. Soja hispida	—	—										
	32. Ulex europaeus												
	33. Dolichos multiflorus . . .	—				—					—		
	34. Vigna sinensis	—				—					—		

bei. Inwieweit insbesondere die spezifische Eiweißnatur der in Frage kommenden Hülsenfrüchte mit dem Ergebnis der bakteriolytischen Prüfung konform geht, hoffen wir, durch weitere Untersuchungen über Eiweißdifferenzierung mit Hilfe serobiologischer Methoden klarstellen zu können.

Wurzelbakterien verschiedener Leguminosen.
— bedeutet negativen Impferfolg ohne Knöllchenbildung.)

III. Lateen				IV. Galegeen	V. Hedysareen				VI. Vicieen								VII. Phaseoleen				
13. Anth. vul.	14. Lot. ul.	15. Lot. corn.	16. Tetr. purp.	17. Rob. pseud.	18, Orn. sat.	19. Onob. sat.	20. Lesp. str.	21. Ar. hyp.	22. Pis. sat.	23. Pis. arv.	24. Vic. sat.	25. Vic. vill.	26. Vic. Faba	27. Lath. odor.	28. Lath. silv.	29. Cicer ar.	30. Phas vul.	31. Soja hisp.	32. Ulex eur.	33. Dolich m.	34. Vigna s.
—					+	—	—	—										—			
		—		—	+	—			—		—		—				—	—		—	—
													—								
—					—				—	—	—	—	—	—	—	—	—				
		—		—	—	—			—		—										
									—												
									—	—	—										
—									—	—	—	—	—	—	—	—	—				
									—	—	—										
									—		—										
									—		—										
+	+		+		—	—											—				
+	+		+																		
		+		—	—	—															
+	+		+																		
		—		+	—	—															
—		—		—	+	—			—		—						—	—			
—					—	+												—			
					—	—	+		—								—				
					—	—		+	—								—				
—					—				+		+	+	+	+	+	+	—				
									+	+	+						—				
					—				+		+	+	+	+	+	+	—				
									+		+	+					—				
									+		+		+				—				
									+		+			+	+						
									+		+			+	+						
									+		+					+					
					—				—		—						+	—			
					—	—			—		—						—	+			
									—		—						—		+		
					—				—		—						—			+	
					—				—		—						—				+

Krüger hat bei seinen Untersuchungen, dem Beispiel von **Zipfel** folgend, durchweg die Agglutinationsmethode in Anwendung gebracht[1]).

---

[1]) Auf die Natur und Technik der serobiologischen Untersuchungsmethoden kann hier nicht näher eingegangen werden; es sei auf das Orig. des Vortrages, sowie die

Die Ergebnisse befinden sich auf umstehender Tabelle, deren Einzelheiten hier jedoch nicht näher berücksichtigt werden können. Die Resultate zeigen eine erfreuliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Impfversuche, und sie bestätigen die Anschauung, daß dem Vegetationsversuch zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse wohl ein besonderer Wert beizumessen ist. Zunächst zeigt die Tabelle — im Gegensatz zu dem Befunde Zipfels —, daß zwischen den Bakterien von Phaseolus vulgaris und Pisum sativum verwandtschaftliche Beziehungen nicht bestehen, dies im Einklang mit den Ergebnissen unserer Vegetationsversuche. Ganz auffallenderweise zeigt sich aber im Gegensatz zu den letzteren zwischen Vicia Faba einerseits und Vicia sativa bzw. Pisum sativum andererseits keinerlei Verwandtschaft bezüglich der Wurzelbakterien. Dieses überraschende, mit Zipfel übereinstimmende Resultat wurde mit Hilfe des sog. Präzipitationsverfahren bestätigt. Trotzdem erschien eine nochmalige Nachprüfung unter Verwendung anderer Bakterienstämme und verschiedener Methoden angezeigt, doch auch diese brachte die gleiche Bestätigung¹). Die Verwendung von Stämmen verschiedener Jahrgänge, also verschiedenen Pflanzen entstammend, welche natürlich auf ihre Infektiosität und Wirksamkeit geprüft waren, stellt das Resultat sicher. Es ist dabei zu beachten, daß die serologischen Prüfungen überhaupt keine verwandtschaftlichen Beziehungen feststellen konnten. Obgleich nämlich die nach Einverleibung von Bakterien im tierischen Organismus gebildeten Reaktionsprodukte zwar artspezifisch sind, so ist deren Wirkung doch nicht streng begrenzt, denn auch verwandte Bakterienarten werden je nach dem Grade der Verwandtschaft mehr oder weniger stark beeinflußt; es gilt dies besonders von der Agglutinationsmethode, welche durch, bei stärkeren Konzentrationen eintretende Ausflockungen in gewissem Maße einen Anhalt für den Grad der verwandtschaftlichen Beziehungen an die Hand gibt. Die Tabelle (p. 472 u. 473) gewährt in dieser Richtung interessante Hinweise, die jedoch noch der Nachprüfung bedürfen. Man beachte, daß die Sera zweier Vicia Faba-Stämme gegenüber den Antigenen aller anderen Leguminosenbakterien, insbesondere auch gegenüber Vicia sativa und Pisum sativum keinerlei Reaktion auslösten, gegen die eigenen Antigene aber sehr scharf reagierten, während die Sera von Vicia sativa und Pisum arvense die beiderseitigen Antigene mit gleicher Schärfe agglutinierten. Dazu die p. 476 zum Ausdruck kommende gegenseitige Vertretbarkeit der Bakterien von Vicia Faba und Vicia sativa beim Vegetationsversuch! Von einer Erklärung dieser interessanten Tatsachen muß zurzeit noch Abstand genommen werden, sie sind aber zweifellos in der Eigenart der Vicia Faba-Pflanze begründet, die ja bekanntlich in ihrem gesamten Habitus, besonders aber durch die Natur ihrer Wurzelausscheidungen und der Extraktivstoffe in der ganzen Pflanze sich wesentlich von den übrigen Arten der Gattung Vicia unterscheidet. Inwieweit die Natur der Eiweißsubstanzen dieser verschiedenen Hülsenfruchtarten sich (wie wir vermuten) unterscheidet, darüber wird auch

---

Dr.-Arbeiten von Zipfel und Krüger verwiesen. Näheres in Czapek, Biochemie der Pflanzen, und Dieudonné, Immunität, Schutzimpfung und Serumtherapie. Bei obigen Versuchen gelangten außer der Agglutination noch die Präzipitationsmethode, sowie das Komplementbindungsverfahren zur Anwendung.

¹) Über diese Versuche wird von Herrn Prof. Klimmer berichtet werden, dem ich zu erneutem Dank dafür verpflichtet bin, daß er die einschlägigen Arbeiten in seinem Institut ausführen ließ.

Ergebnisse der Agglutinationsversuche.

Antigene	Spezifische Sera								
	Lup. per.	Lup. ang.	Trifolium	Trifolium	Melilotus	Medicago lup.	Trigonella	Lotus	Anthyllis
Lupinus perennis .	†† **1 : 1000**	† **1 : 1000**	* 1 : 20	—	—	—	—	* 1 : 20	—
„ luteus . .	†† **1 : 1000**	—	* 1 : 20	—	* 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	—
„ angustifolius	A.	† **1 : 1000**	* 1 : 20	—	* 1 : 20	A.	—	* 1 : 20	—
„ albus . .	A.	—	—	—	* 1 : 20	—	—	—	—
Trifolium pratense .	* 1 : 20	* 1 : 20	††† **1 : 5000**	††† **1 : 10 000**	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 20	† **1 : 250**	† 1 : 20
Melilotus albus . .	† 1 : 20	—	—	† 1 : 20	††† **1 : 5000**	†† **1 : 50**	†† **1 : 500**	—	* 1 : 20
Medicag. lupulina .	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 100	† 1 : 20	† 1 : 20	††† **1 : 500**	† **1 : 1000**	* 1 : 20	* 1 : 20
„ sativa . .	—	—	—	—	—	—	† **1 : 1000**	—	* 1 : 20
Trigonella Foenugraeceum . . .	† 1 : 20	—	—	—	†† **1 : 50**	†† **1 : 50**	††† **1 : 5000**	—	† 1 : 250
Lotus uliginosus . .	† 1 : 100	A.	A.	† 1 : 100	* 1 : 20	* 1 : 20	—	A.	††† **1 : 500**
Anthyllis vulneraria	A.	—	—	—	* 1 : 20	* 1 : 20	—	—	††† **1 : 5000**
Tetragonolobus purpureus.	A.	† 1 : 20	† 1 : 20	†† 1 : 50	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	†† **1 : 50**	††† **1 : 500**
Vicia sativa . . .	* 1 : 20	† 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	* 1 : 20
„ Faba	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	* 1 : 20
Pisum arvense . .	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 100	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20
Phaseolus vulgaris .	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 100	† 1 : 50	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 20
Soja hispida. . . .	A.	* 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	—	—	† 1 : 20	—
Onobrychis sativa .	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 50	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 50
Ornithopus sativus 1908.	†† **1 : 1000**	† **1 : 1000**	—	—	—	—	—	* 1 : 50	—
Ornithopus sativus 1910.	—	—	* 1 : 20	—	—	—	—	—	—

††† bedeutet völlige Agglutination bei der angegebenen Verdünnung, †† mittelstarke Agglutination, † schwache Agglutination.
* bedeutet kleiner als und Ausbleiben der Reaktion.

Ergebnisse der Agglutinationsversuche (Fortsetzung).

Antigene	Spezifische Sera									
	Tetragonol	Vicia sat.	Vicia Fab.	Pisum arv.	Vicia Fab.	Phaseol.	Soja	Onobrychis	Ornith. 1908	Ornith. 1910
Lupinus perennis .	—	—	* 1 : 20	* 1 : 20	—	† 1 : 50	* 1 : 20	—	—	†† **1 : 500**
„ luteus . .	—	—	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	—	†† 1 : 50	—	† **1 : 5000**	†† **1 : 1000**
„ angustifolius	* 1 : 20	† 1 : 20	—	—	* 1 : 20	—	A.	† 1 : 100	† **1 : 5000**	† **1 : 1000**
Lupinus albus . .	—	—	—	—	—	—	A.	—	—	A.
Trifolium pratense	† 1 : 20	—	† 1 : 50	* 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 50	* 1 : 20	† 1 : 20	—	* 1 : 20
Melilotus albus . .	* 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	—	† 1 : 20	* 1 : 20	—	—	—
Medicag. lupulina	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	† 1 : 50	* 1 : 20	* 1 : 20
„ sativa .	—	* 1 : 20	—	—	—	—	—	—	—	—
Trigonella Foenugraeceum . . .	†† 1 : 100	* 1 : 20	† 1 : 50	† 1 : 50	—	† 1 : 50	—	† 1 : 20	—	† 1 : 50
Lotus uliginosus .	††† **1 : 50**	† 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 100	* 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	—	† 1 : 100
Anthyllis vulneraria	† 1 : 20	* 1 : 20	A.	A.	* 1 : 20	† 1 : 100	* 1 : 20	—	* 1 : 20	A.
Tetragonolobus purpureus. . .	††† **1 : 10000**	† 1 : 20	† 1 : 100	† 1 : 100	† 1 : 20	† 1 : 100	* 1 : 20	† 1 : 50	† 1 : 20	A.
Vicia sativa . . .	† 1 : 20	†† **1 : 250**	† 1 : 20	††† **1 : 1000**	* 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 100	† 1 : 50	† 1 : 100
„ Faba . . .	† 1 : 20	† 1 : 20	††† **1 : 1000**	* 1 : 20	†† **1 : 500**	† 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 100
Pisum arvense . .	† 1 : 20	†† **1 : 250**	† 1 : 20	††† **1 : 1000**	* 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 20	† 1 : 50	† 1 : 100	—
Phaseolus vulgaris	† 1 : 20	* 1 : 20	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	††† **1 : 5000**	* 1 : 20	† 1 : 50	† 1 : 20	† 1 : 50
Soja hispida . . .	—	—	—	—	* 1 : 20	—	††† **1 : 1000**	—	* 1 : 20	A.
Onobrychis sativa	† 1 : 50	† 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	†† **1 : 1000**	* 1 : 20	† 1 : 20
Ornithopus sativus 1908	* 1 : 20	—	* 1 : 20	* 1 : 20	* 1 : 20	—	* 1 : 20	—	† **1 : 5000**	†† **1 : 1000**
Ornithopus sativus 1910	—	—	—	—	—	—	—	—	—	†† **1 : 1000**

der tierische Organismus in seinen Reaktionsprodukten, den spezifischen Eiweißpräzipitinen, die zutreffende Antwort geben.

Die bei diesen Versuchen zutage getretene Verschiedenartigkeit in den Wirkungen unserer Leguminosen-Wurzelbakterien findet an sich ihre ungezwungene Erklärung in der Erkenntnis, daß *Infektiösität und Stickstoffsammlungsvermögen beim Vegetationsversuch vitale Äußerungen physiologischer Natur, die Bildung spezifischer Reaktionsprodukte im Blute des tierischen Organismus aber eine Wirkung, losgelöst vom Lebensprozeß der Bakterien, nach der biologisch-chemischen Seite hin darstellt.* Hier kommt der Einfluß der Wirtspflanze als Substrat auf die Wurzelbakterien deutlich zum Ausdruck, und das abweichende Verhalten der *Vicia Faba*-Bakterien stimmt durchaus überein mit der Sonderstellung, welche dieser Pflanze, wie schon gesagt, im natürlichen Verwandtschaftssystem der Pflanzen zukommt. Denn die Zugehörigkeit zur Gattung *Vicia* ist für die Pferdebohne nur in der morphologischen Natur der Blütenbildung begründet.

Können somit serologische Prüfungen auch wertvolle Anhaltspunkte für die Feststellung der natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse höherer Pflanzen abgeben, so muß ihre Bedeutung für die verwandtschaftlichen Beziehungen der Leguminosen-Wurzelbakterien doch zurücktreten hinter dem physiologischen Moment, welches in der Infektiösität und dem Stickstoffsammlungsvermögen zum Ausdruck kommt, welche beide das Resultat einer ungezählte Generationen hindurch währenden physiologischen Anpassung sind.

Es erscheint mir deshalb die Aufstellung von Verwandtschaftsgruppen der Leguminosen-Wurzelbakterien in folgender Anordnung berechtigt:

I. *Lupinus angustifolius, Lup. luteus, Lup. perennis, Ornithopus sativus.*

II. *Trifolium pratense, Tr. incarnatum, Tr. hybridum, Tr. repens.*

III. *Medicago sativa, Med. lupulina, Melilotus albus, Trigonella Foenumgraecum.*

IV. *Anthyllis vulneraria, Lotus uliginosus und corniculatus, Tetragonolobus purpureus.*

V. *Pisum sativum, Pis. arvense, Vicia sativa, Vic. villosa, Vicia Faba, Lathyrus odoratus, Lath. silvestris, Cicer arietinum.*

Eine Sonderstellung nehmen ein: Laburnum vulgare, Onobrychis sativa, Lespedeza striata, Arachis hypogaea, Phaseolus vulgaris, Soja hispida, Ulex europaeus, Dolichos multiflorus, Vigna sinensis, Robinia pseudacacia.

Von mehr theoretischem Interesse ist die Frage, wie weit der Begriff der Spezifität bzw. des Verwandtschaftsverhältnisses zu ziehen ist. Was sind denn Pferdebohnenbakterien, was sind Saatwickenbakterien? Naturgemäß die aus den Knöllchen der betreffenden Pflanzen reingezüchteten Knöllchenerreger. Da dieselben aber gegenseitig infektiös wirken, behalten sie auch bei wechselseitiger Impfung als Knöllchenerreger in der artfremden Pflanze spezifische Eigentümlichkeiten von der früheren Wirtspflanze her bei, sind es jetzt noch Pferdebohnenbakterien bzw. Saatwickenbakterien oder sind beide in die andere Form übergeführt? Wie werden diese Kreuzungsbakterien serologisch wirken, wie z. B. Saatwickenbakterien, welche einmal kürzere oder längere Zeit in der Pferdebohne gelebt haben? Wir werden diesen Fragen experimentell näher treten. Nach medizinischen Erfahrungen mit pathogenen Keimen würde zu erwarten sein, daß die physiologische Eigenart auch in der fremden Pflanze beibehalten wird. Manche praktische Erfahrungen weisen darauf hin, daß dies auch in gewissem Grade bei den Hülsenfrüchten der Fall ist. Immerhin sind aber doch die den Knöllchen der verschiedenen Leguminosenarten entstammenden Bakterien nach ihrer Wirtspflanze zu benennen, wissen wir doch schließlich nicht, durch welche wirksame Form dieselben ursprünglich hervorgerufen worden sind.

Der Anwendung serologischer Untersuchungsmethoden dürfte auch in der Botanik noch ein weites Feld offenstehen. Derartige Arbeiten wurden ja bereits mehrfach ausgeführt, und auch von uns sind einschlägige Untersuchungen in verschiedener Richtung beabsichtigt bzw. eingeleitet, von denen einige angedeutet seien. Die Ansichten über die systematische Stellung der Leguminosen-Wurzelbakterien, ihre Beziehungen zu den anderen Pilzen usw. gehen bekanntlich weit auseinander; im Hinblick auf die Magnus-Friedenthalschen Ergebnisse mit Hefe, Trüffel und Champignon ist hier eine Klärung wohl zu erwarten[1]). Von Interesse für unsere Untersuchungen dürften auch die verwandtschaftlichen Beziehungen der Eiweißstoffe der verschiedenen Leguminosenarten, auch das Verhalten der Immunsera aus den Knöllchen derselben u. a. sein. Die verschiedenartige Natur des Samen-Eiweiß hat Rhelander zur Unterscheidung von Handelssämereien verschiedener Herkunft mit allerdings nicht ganz einwandsfreiem Erfolg herangezogen; in anderer Richtung jedoch beispielsweise zur Identifizierung gleich aussehender Samenarten, von Rassen und dergl. (Raps und Rübsen: Kohlrüben, Zuckerrüben: Runkelrüben) könnten die serologischen Methoden eventuell von großem Wert für Samenkontrolle, Handel und landwirtschaftliche Praxis werden. Auch die Erkennung und Identifizierung von Pflanzenkrankheiten sowie die Anschauungen über die Entstehung mancher derselben (Malvenrost, Mykoplasmatheorie) können auf eine sicherere Grundlage gestellt werden, und unsere Erkenntnis über das Wesen der Pflanzenkrankheiten eine wichtige Bereicherung erfahren; ja es dürften die Gewinnung von wirksamen Bekämpfungssera gegen manche Pflanzenkrankheiten und die Möglichkeit einer Immunitätserzeugung nicht zu den Utopien zu rechnen sein. Die aus unseren Untersuchungen hervorgehende Tatsache, daß die physiologische und die serologische Wirksamkeit der Bakterien Momente sind, die sich nicht zu decken brauchen, daß physiologisch different wirkende Bakterienarten Sera von gleicher Wirkung geben können, läßt die Gewinnung wirksamer Sera auch gegen menschliche Infektionskrankheiten durch Verwendung unschädlicher anderer Bakterienspezies als wohl möglich erscheinen. —

Die einheimischen Leguminosen bilden in unseren Böden durchweg spontan Knöllchen, d. h. die notwendigen Erreger sind allenthalben vorhanden. Allerdings verhält sich die Sache auf Neuland und auf sterilen Sandböden oder bei tieferen Bodenschichten entstammender Erde ganz anders: Hier bleiben selbst so häufig angebaute Kulturpflanzen wie Rotklee, Pferdebohnen usw. meist knöllchenfrei, mindestens werden nur vereinzelte mehr oder minder unwirksame Knöllchen gebildet, da die spezifischen Anpassungsformen fehlen. Selten angebaute Kulturpflanzen, Serradella u. a., bleiben durchweg knöllchenfrei. Von Interesse muß daher die Frage sein, wie sich exotische Leguminosen in unseren Böden verhalten. In dieser Richtung haben wir eine große Reihe ausländischer Leguminosen, welche im Dresdener Botanischen Garten kultiviert werden, auf ihren Knöllchenbesatz geprüft: Die wildwachsenden Vertreter bildeten sämtlich, meist reichlich, große und gesunde Knöllchen aus (s. Vortrag). Anders die fremden Kulturpflanzen: Die japanische Soja hispida hat bei unseren zahlreichen Gefäß- und Feldversuchen nie spontan Knöllchen gebildet; Arachis hypogaea bleibt meist völlig knöllchenfrei, unter Umständen bilden sich kleine, hohle, unwirksame Knöllchen; ebenso Lespedeza striata; Vigna sinensis und die Dolichos-Arten blieben stets knöllchenfrei; die bei uns sich immer mehr einbürgernde, aus Portugal stammende, Ornithopus sativa bildet bei erstmaligem Anbaue nur vereinzelte, kleine, unwirksame Knöllchen. Ein Analogon hierzu liefert die bekannte Tatsache, daß beispielsweise unsere gewöhnliche Erbse, welche hier in jedem Boden sofort reichlich große Knöllchen bildet, in unseren afrikanischen Kolonien knöllchenfrei bleibt! Die erst erwähnte Beobachtung leitet zwingend auf die Annahme einer neutralen Form des Bacterium radicicola im Boden über[1]). Anders die schon seit langem in sorgfältigem Anbau befindlichen und vielfach hochgezüchteten Kulturpflanzen, diese bilden, sofern sie fremd, in unseren Böden zunächst wenigstens keine oder wenige und unwirksame Knöllchen, welche durch verwandte Formen hervorgerufen werden; zur Bildung wirksamer Knöllchen benötigen sie der angepaßten, nur bei ihnen wirksamen Art. Ob diese angepaßten Formen allmählich aus der neutralen Bodenform sich bilden und herangezüchtet werden können, ist noch nicht erwiesen. Es gelingt zwar durch fortgesetzten Anbau, einen Acker allmählich serradellafähig zu machen, es ist jedoch wahrscheinlich, daß hier verwandte Bakterienarten im Boden vorhanden sind und die ersten wirksamen Infektionen hervorrufen. Bei Soja, Lespedeza, Vigna, Dolichos, Arachis u. a. ist uns eine Anpassung nicht gelungen. Umgekehrt, auch eine Entfremdung angepaßter Formen, etwa eine Zurückführung in die neutrale Form ist nicht geglückt.

---

[1]) s. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1906.

Die Anpassung, denn mit einer solchen haben wir es zweifellos zu tun, ist also in weitgehendem Maße als konstant zu bezeichnen. Diese angepaßten Formen zeigen eine vollkommene und beständige Vererbung erworbener Eigenschaften, und deshalb könnte, solange nicht gegenteilige Beobachtungen vorliegen, d. h. Überführungen einwandsfrei gelungen sind, auch für die Knöllchenbakterien verschiedener Herkunft in den angegebenen Gruppen am Artbegriff festgehalten werden. Im Hinblick aber auf unsere vorstehend wiedergegebenen Versuche sowie auf die differenten Verhältnisse bei den wild wachsenden und den seit langer Zeit in Kultur befindlichen Leguminosen, erscheint dies nicht angebracht, da zwischen den an wild wachsenden und den an Kulturpflanzen spontan knöllchenbildenden Bakterienformen wohl zu unterscheiden ist: Die Wurzelbakterien der Leguminosen sind vielmehr als mehr oder minder konstante Anpassungsformen der Spezies Bacterium radicicola aufzufassen.

---

[1]) s. Nobbe u. Hiltner, Landw. Vers.-Stat. 1893 u. 1894.

Referate.

von Tubeuf, C., Pflanzenpathologische Bilder und Notizen aus den nordamerikanischen Wäldern. 1. Caeoma an Pseudotsuga Douglasii und Uredo an Chamaecyparis nutkaensis. (Naturwiss. Zeitschr. f. Forst- u. Landwirtsch. 1914. p. 89—91.)

Auf der Nutka-Cypresse (Chamaecyparis nutkaensis) fand Verf. am Mt. Ramier (Cascaden-Geb.) Uredolager (einstweilen Uredo Chamaecyparidis nutkaensis): Sporen 28—32 μ dick, breit oval, nach unten verjüngt; Membran sehr fein punktiert, seitlich gesehen sehr fein gestreift, ohne kahle Stellen. Keine Peridie oder Pseudoperidie, jede Spore auf einem langen, farblosen Stiel. An der Douglastanne (Pseudotsuga Douglasii) fand sich ein Caeoma-Stadium (einstweilen Caeoma Pseudotsugae Douglasii); sie gehört vielleicht zu einer in der Nähe auf Populus trichocarpa vorkommenden Melampsora. Bei beiden Koniferen waren Uredineen-Krankheiten bisher nicht bekannt.

Erwähnt wird noch an demselben Fundort Exoascus aureus auf Populus trichocarpa. In Deutschland kommt dieser Pilz auf P. nigra und canadensis vor und geht auch auf P. Siemonii, nicht auf P. balsamifera und candicans über.

Rippel (Augustenberg).

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Buchta, Ludwig, Über den Einfluß des Lichtes auf die Sprossung der Hefe, p. 340.

Greaves, J. E., A Study of the bacterial Activities of virgin and cultivated Soils, p. 444.

Kita, G., Einige japanische Schimmelpilze, p. 351.

—, Über die Asporogenität der Sojahefen, p. 364.

Klaeser, M., Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten und Ammoniak durch Bakterien, p. 365.

Lipman, C. B., and **Burgess, P. S.,** Antagonism between Anions as affecting Soil Bacteria, p. 430.

Northrup, Zae, A bacterial Disease of the Larvae of the June Beetle, Lachnosterna spp., p. 321.

Schroeder, Harold, The bacterial Content of Coal, p. 460.

Originalberichte über Kongresse, Versammlungen etc.

Simon, Josef, Über die Verwandtschaftsverhältnisse der Leguminosen-Wurzelbakterien, p. 470.

Referate.

von Tubeuf, C., Pflanzenpathologische Bilder und Notizen aus den nordamerikanischen Wäldern. 1. Caeoma an Pseudotsuga Douglasii und Uredo an Chamaecyparis nutkaensis, p. 480.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 6. Juni 1914.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. No. 18|23.
Ausgegeben am 22. Juli 1914.

Nachdruck verboten.

Die Mikroflora des Liptauer Käses und ihre Rolle beim Reifen und Scharfwerden desselben.

[Mitteilung der Kgl. Ung. Milchwirtsch. Versuchsstation in Magyaróvár.]

Von **O. Gratz** und **K. Vas.**

Mit 1 Textkurve.

I. Einleitung.
II. Literatur.
III. Untersuchungsmethoden:
  Qualität und Abstammung der untersuchten Käse;
  Konservierung der Käse;
  Probeentnahme;
  Verdünnungen und Nährböden.
IV. Vorgehen bei der Bestimmung und Beschreibung der isolierten Mikroben.
V. Beschreibung der Mikroben aus den Liptauer Käsen:
  Mikrokokken,
  Bakterien,
  Aërobe Bazillen,
  Anaërobe Bazillen,
  Actinomyces,
  Oidium und Sproßpilze.
VI. Quantitative und qualitative Ergebnisse.
VII. Welchen Mikroben ist bei der Reifung eine Bedeutung beizumessen?
VIII. Besteht zwischen der Flora und dem Scharfwerden ein Zusammenhang?
IX. Geschmacks- und Konsistenzveränderungen, Säurezahl usw. in den untersuchten Käsen.
X. Was ist die Ursache der starken Fettspaltung in manchen Liptauerkäsen?
XI. Zusammenfassung.

I. Einleitung.

Die Fabrikation des Liptauer Käses weicht stark von der Bereitungsweise anderer Käsesorten ab. Die großen Unterschiede liegen darin, daß der Liptauer nicht direkt aus Milch, sondern aus mehreren, an verschiedenen Orten, unter verschiedenen Verhältnissen, mit einer mehr oder minder voneinander abweichenden Technik bereiteten Käsen (gomolya)[1] zustande kommt. Infolgedessen müssen wir voraussetzen, daß wir im Liptauer mit einer dem Rohmaterial (gomolya) gegenüber abgeänderten Mikroflora und anderen enzymatischen Verhältnissen zu rechnen haben. Bei anderen Käsesorten, wenn dieselben einmal fertig sind, können sich zu der Flora des Käse-Innern keine neuen Mikroben mehr gesellen, ja die immer dicker werdende Rinde schützt diese immer mehr. Beim Liptauer ist dies aber nicht der Fall.

Es erleiden bei anderen Käsesorten auch die Enzymverhältnisse nicht eine derartige Änderung wie beim Liptauer Käse.

Die genannten zwei Faktoren, die Änderung der Mikroflora und der Enzymverhältnisse, müssen für das weitere Los des Käses, für seine Reifung und Reifungsrichtung gewiß ausschlaggebend sein. Zu erforschen, welche

---

[1] Bereitungsweise siehe dies. Centralbl. Abt. II. Bd. 33. 1912. p. 401.

Bedeutung den genannten Faktoren zukommt, bezwecken die vorliegenden Untersuchungen, um dann auf diese Weise zu nützlichen Schlußfolgerungen für die Praxis der Liptauer Käsebereitung zu gelangen.

Die Mikroflora und Bereitung des Liptauers. Während dem Abschälen und Zerschneiden in handgroße Stücke gelangt das Käse-Innere wiederholt mit der keimreichen Oberfläche und Rinde der Käse in Berührung. Das Messer selbst verschleppt die Keime auf die Schnittfläche des Käse-Innern; daß dies der Fall ist, sahen wir bei unseren „gomolya"-Untersuchungen. Schnitten wir die Käse mit sterilem Messer zur Probeentnahme durch, so fanden wir immer auf den Platten aus dem Käse-Innern das auf der Rinde immer reichlich vorhandene Oidium lactis, jedoch nicht, wenn wir die Käse entzweibrachen. Auf dieselbe Weise werden wohl auch andere Keime von der Rinde den Weg in den Liptauer finden. Wird, wie dies in kleinen Betrieben der Fall ist, der Rindelkäse und Liptauer auf derselben Maschine gemahlen, so bedeutet dies auch eine Infektionsquelle für letzteren.

Mit dem Salz gelangen neuerdings Keime in den Liptauer. Kieler Versuche[1]) bestätigten Rappin und Grosserons[2]) Untersuchungen, daß manche Salzsorten 80 000 und mehr Keime, darunter für Butter und Käse gefährliche, enthalten. Viele Fabrikanten geben das Salz in Wasser gelöst zum Käse. Ist das Wasser bakteriologisch nicht einwandfrei, so können mit demselben auch neue Keime dem Liptauer zugeführt werden, wie dies bei der Butter der Fall ist. Überhaupt gleicht der Liptauer, was die plastische, knetbare Konsistenz und die damit verbundenen Verhältnisse anbelangt, sehr der Butter.

Die Knetwalzen verläßt der Liptauer in losen Flocken, so daß sozusagen nur der kleinste Teil mit der Luft in Berührung gelangt. Die auf diese Weise aus der Luft in den Käse gelangenden Keime sind aber wohl kaum von Bedeutung für denselben. Jedoch kann diese Berührung mit der Luft, wenn der Käse allzulange in den losen Flocken in den Trögen liegen bleibt, eine andere Bedeutung haben. Einesteils ist eine Oxydation des Käsefettes, andererseits eine Vermehrung aërober Mikroben nicht ausgeschlossen. Nahrung und Luft steht ja reichlich zur Verfügung; es überzieht sich ja auch sehr schnell, von Heute auf Morgen, in dem Tönnchen die Oberfläche des Liptauers mit Oidium lactis, sobald wir demselben bereits etwas entnommen haben, oder derselbe ein wenig eingetrocknet und so der Luftzutritt möglich ist.

Da aus mehreren Käsen bereitet, droht dem Liptauer Käse auch von Seiten abnormal gereifter Käse eine Infektion. So ist z. B. eine Infektion mit Buttersäurebakterien nicht ausgeschlossen, welche bekanntlich bei den Hartkäsen abnormale Reifungserscheinungen hervorrufen. Da das Naturlab, wie wir uns durch bakteriologische Untersuchungen überzeugten, oft sehr reich an fettspaltenden Hefen und Bakterien ist, ist es nicht ausgeschlossen, daß mit einzelnen Käsen eine große Menge solcher in den fertigen Käse gelangt.

Die soeben geschilderten nachträglichen Infektionsmöglichkeiten können sowohl mit der normalen, als auch mit den, beim Liptauer nicht eben seltenen, abnormalen Reifungserscheinungen und der Haltbarkeit des Produktes in Zusammenhang stehen. Zu den abnormalen Reifungserscheinungen gehören das Bitter-, Klebrig-, Speckig- und besonders das Scharfwerden.

---

[1]) Molkereizeitung, Hildesh. Bd. 26. 1912. p. 890.

[2]) Ref. Kochs Jahresber. (21. 1910). 1913.

Am bedeutungsvollsten von diesen ist das Scharfwerden des Liptauer Käses, eine der häufigsten Erscheinungen, die jedoch eigentlich nicht unbedingt als abnormale Reifungserscheinung aufgefaßt werden kann. Im Gegenteil, solange der Liptauer nur in geringerem Grade scharf ist, kann man den Prozeß noch zur normalen Reifung rechnen. Es erlangt nämlich schon nach einer kurzen Zeit ein jeder Liptauer einen angenehmen, nur sehr schwach scharfen Geschmack, der zum Charakter des Käses gehört und von Kennern geschätzt und verlangt wird. Es ist jedoch oft, besonders bei dem für den Winter eingelagerten Käse, der Fall, daß der Liptauer außerordentlich beißend-scharf und kratzend wird, jedoch tun das nicht alle Käse, wie wir noch sehen werden. Ist dies auch keine normale Erscheinung, so ist dieselbe doch für den Fabrikanten nicht schädlich, da sich solcher Käse besser konserviert und, mit frischem, mildem Käse gemischt, ein ganz annehmbares Produkt (Winterkäse) gibt.

Die Ursache des Scharfwerdens. Orla Jensen[1]) gibt an, daß der Schärfe mancher Käse, falls keine Valerian- oder Buttersäuregärung stattfindet, also bei den allermeisten Labkäsen, eine Fettspaltung zugrunde liegt. Die Schärfe ist in dem Falle proportional der Fettspaltung im Käse. Bezüglich des Liptauers hat Fodor[2]) auf unserer Versuchsstation ebenfalls gefunden, daß die Schärfe desselben den bei der Fettspaltung freiwerdenden flüchtigen Fettsäuren zuzuschreiben ist.

Bezüglich des oben Gesagten wäre es denkbar, daß in gewisse Käse auf irgendeine Weise reichlich fettspaltende Mikroben gelangen und daß dies die Ursache ist, daß manche Käse schärfer werden, oder mit anderen Worten, daß in einem Käse die Fettspaltung rascher verläuft und einen größeren Umfang annimmt, als in anderen. — Es wären also etwa dieselben Verhältnisse vorhanden, wie in der Butter, in welcher ja die Fettspaltung ausschließlich fettspaltenden Mikroben und deren Enzymen zugeschrieben wird.

Eine Vermehrung von obligat aëroben Mikroben, bekanntlich sind die fettspaltenden zumeist solche, ist, falls die Käse, wie dies in der Praxis meist der Fall ist, nach dem Mahlen schnell in die Tönnchen eingestampft werden, kaum anzunehmen. Gänzlich ausgeschlossen ist dies aber wohl nicht, wenn wir bedenken, daß zwischen den Käseteilchen gewiß etwas Luft eingeschlossen wird. Sollte eine Vermehrung von obligat aëroben Mikroben stattfinden, so ist diese jedoch gewiß nur von kurzer Dauer, und zwar nur unmittelbar nach dem Füllen der Tönnchen der Fall.

Sollte der gemahlene Käse jedoch im lockeren Zustande längere Zeit stehen, was auch vorkommen mag, so ist die Möglichkeit der Vermehrung aërober Mikroben natürlich eher vorhanden; wie ja bereits erwähnt, überzieht sich ein nicht luftdicht aufbewahrtes Stückchen Liptauer Käse oder „gomolya“ äußerst schnell mit Oidium lactis.

Von größerer Bedeutung scheinen die fakultativen Anaëroben zu sein, wie Hefen, einige Kokken, weiter vielleicht die obligat anaëroben Putrificus-Arten, die nach Söhngen[3]) kräftige Fettspalter sind. Wir können jedoch aus später zu erwähnenden Gründen auch an die anaëroben Buttersäurebakterien denken, von denen ja, wie erwähnt, auch Orla Jensen festgestellt hat, daß sie die Ursache der Schärfe der Käse sein können. Die genannten Mikroben können Oxygen mehr oder weniger entbehren und sind zum Teil, wie Hefen, Kokken und Buttersäurebakterien, auch nicht so sehr säureempfindlich, daß man voraussetzen könnte, daß sie die anfänglich im Käse herrschende Reaktion nicht vertragen, was nicht aus den Augen zu verlieren ist, wenn wir an die Vermehrung von Mikroben im Käse denken.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 762.

[2]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 25. 1913. p. 89; Kisérl. Közlemények. XV. 1912. p. 450.

[3]) Folia mikrob. 1912 I. p. 234.

Daß die stärkere Fettspaltung in manchen Käsen der Mikrobenwirkung zuzuschreiben ist, und daß durch einen scharfen Käse ein normal gereifter infiziert werden kann, schien durch folgende Beobachtung bekräftigt zu werden[1]):

Mehrere normale, mit einem scharfen gemischte Käse gaben nach Verlauf eines Halbjahrs einen außerordentlich scharfen Käse. War die Säurezahl des Käsefettes unmittelbar nach dem Mischen 21,5, so stieg sie nach der genannten Zeit auf 122. Freilich ist es in diesem Falle auch nicht ausgeschlossen, daß bereits nicht mehr gewisse Mikroben, sondern die Lipase derselben dem scharfen Käse beigemischt worden ist, daß also die alsdann stattgefundene starke Fettspaltung nicht einer direkten Mikrobentätigkeit zuzuschreiben ist. Es wurde auch versucht, aus einem scharfen Käse Lipase zu gewinnen, jedoch ohne Erfolg, was aber nicht gegen obige Annahme spricht, da ja bekanntlich die Enzyme von gewissen Stoffen adsorbiert werden, und, wie Söhngen[2]) erst vor kurzem zeigte, die Mikrobenlipasen von den Fettsäuren gern zurückgehalten werden.

Gelegentlich weiterer, noch nicht mitgeteilter Untersuchungen stellte sich heraus, daß in einem Käse eine größere Menge nicht von Fettspaltung herrührender flüchtiger Fettsäuren, besonders Buttersäure, zu finden war. Sollten weitere Untersuchungen zeigen, daß dies in scharfen Käsen häufig der Fall ist, so würde dies gewiß zum Scharfwerden beitragen, oder in manchen Fällen die alleinige Ursache bilden. Bezüglich des Ursprunges der nicht von Fettspaltung herrührenden flüchtigen Fettsäuren kommt besonders die Vergärung des Calciumlactats durch Buttersäurebakterien in Betracht.

Die Änderung der Enzymverhältnisse durch das Kneten. Die Rinde der Gomolyakäse wird während der 8—10, selten mehr Tage, wo der Käse reift, und zum Mahlen fertig wird, nicht, wie dies bei anderen Käsesorten der Fall ist, einer sogenannten „Rindenbehandlung" unterworfen. Auf luftigen Regalen liegen die Käse und überziehen sich infolgedessen schnell mit Oidium lactis. Werden dieselben etwa einigemal mit einem trockenen Tuche abgerieben, was jedoch selten der Fall ist, so begünstigt dies wohl nur die schnellere Ausbreitung der Oidien auf der Rinde, weshalb wir das Oidium lactis auch immer auf den Käsen finden. Andere Mikroben kommen neben dem Oidium auf der Käserinde deshalb nur selten oder wenig zur Geltung. Die Enzyme des Oidium lactis, eine Protease und Lipase dringen langsam in die Käsemasse ein. Daß dies der Fall ist, sieht man an manchen, vom Oidium lactis stärker angegriffenen Stellen; hier wird der unter der Rinde befindliche Teil des Käse durch die Protease des Oidium erweicht und verflüssigt, ähnlich wie man dies bei den von der Rinde aus reifenden Weichkäsen sehen kann. Daß sich nicht unterhalb der Rinde eine besondere Mikroflora findet, zeigten wir bei der bakteriologischen Untersuchung der Gomolyakäse[3]). Die Flora ist im Käse-

---

[1]) Fodor, Kisérl. Közl. XV. 1912. p. 450.
[2]) Folia Mikrobiol. I. 1912. p. 234.
[3]) l. c.

Innern und in der Schicht unterhalb der Rinde dieselbe. Wir wissen aber heute auch, daß selbst bei den Hartkäsen in den äußeren Teilen die Fettspaltung stärker ist als in der Mitte[1]).

Die Partie unterhalb der Rinde ist nach obigen Ausführungen reich an Enzymen, die der Hauptsache nach dem auf der Oberfläche der Käses wachsenden Oidium zuzuschreiben sind. Wird nun der Käse gemahlen, so werden die äußeren enzymreichen Teile des Käses mit den inneren Teilen gemischt und in innige Berührung gebracht. Auf diese Weise ändern sich die Enzymverhältnisse im Liptauer, wenn derselbe bloß aus einem Käse bereitet wird.

Werden aber mehrere Käse zusammen gemahlen, wie dies zumeist der Fall ist, so darf nicht vergessen werden, daß einzelne Käse entweder infolge einer längeren Lagerzeit, oder weil sie klein sind und so eine relativ große Oberfläche besitzen, reicher an Enzymen sein können. Mehr von den Enzymen gelangt dann auch in den Liptauer, wenn die Gomolyakäse nicht geschält, sondern nur abgeschabt werden, was wohl für die Qualität weniger gut, jedenfalls aber rentabel ist, wenn wir uns daran erinnern, daß durch stärkeres Schälen ein größerer Prozentsatz von minderwertigem Rindelkäse gewonnen wird. —

Die soeben skizzierten Verhältnisse berühren mehrere mikrobiologische und enzymologische Fragen. Mit einem Teil beschäftigen sich die hier vorliegenden Untersuchungen. Wir suchten dabei hauptsächlich folgende 3 Fragen zu beantworten:

1. Welche qualitativen und quantitativen Änderungen erleidet die Flora der Liptauer während des Lagerns?
2. Sind die nachträglich während der Bereitung des Liptauers in den Käse gelangenden Mikroben von Bedeutung für denselben?
3. Ist die in einzelnen Käsen stattfindende Fettspaltung das Werk von Mikroben, wenn ja, welche sind daran beteiligt?

II. Literatur.

Mit der bakteriologischen Erforschung des Liptauer Käse beschäftigte sich bisher bloß eine Arbeit, nämlich die von Laxa[2]). Laxa untersuchte 6 Liptauer Käse mittels Peptonmolkengelatineplatten und fand pro Gramm 6,300 000—140 000 000 Milchsäurebakterien, 48 000—400 000 Oidium lactis und Sproßpilze, Tyrothrix-Arten aber bloß in 2 Käsen, 4000—60 000 an der Zahl. Die isolierten Milchsäurebakterien gehören alle zum Typus des Bact. lactis acidi (Strept. lactis) und unterscheiden sich voneinander durch ihre Säuerungsintensität und Aromabildung. Beständig fand Laxa in den untersuchten Käsen einen peptonisierenden Kokkus, den er „Karpathenkokkus“ nennt und dem er bei der Reifung des Liptauer Käses eine wichtige Bedeutung zuschreibt. Außer dem Kokkus soll sich auch Oidium lactis, besonders aber dessen in den Käse diffundierende Kasease, beteiligen, da der Käse in den Tönnchen immer bald vom Oidium überzogen ist.

III. Untersuchungsmethoden.

Die Qualität und Abstammung der untersuchten Käse. Ausgenommen eine Probe, die aus einer anerkannten Schafmilchwirtschaft bezogen wurde, kamen die Käseproben aus den ersten Liptauer Käsereien Oberungarns. Wir erhielten alle Proben als frisch bereitete Hochprima-Qualitäten, denen sie auch alle entsprachen.

---

[1]) conf. Jensen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 292.

[2]) Revue Génér. du Lait. T. 6. 1907. p. 505—509.

Die Konservierung der Käse. Da unser Ziel die Klärung des Verhältnisses zwischen der Mikroflora und den Reifungserscheinungen war, so wollten wir die Käse von der Zeit ihrer Bereitung an in ihren verschiedenen Reifestadien bakteriologisch untersuchen. Wir dachten, die Flora fortlaufend zu verfolgen, da wir voraussetzen, daß parallel mit derselben auch die normalen oder eventuell sich entwickelnden abnormalen Änderungen des Käses Hand in Hand gehen. Es erschien ja plausibel, daß z. B. vor dem Scharfwerden oder während desselben eine Vermehrung besonderer Mikroben stattfindet.

Um die Käse in Zwischenräumen von einigen Wochen ein halbes Jahr hindurch untersuchen zu können, hatten wir für Konservierung derselben zu sorgen. Es war uns nämlich bekannt, daß in den kleinen Tönnchen zu 1—5 kg, in denen der Liptauer auf den Markt kommt, bald ein starker Wasserverlust stattfindet, infolgedessen der Käse sich von der Wand zurückzieht und auch Sprünge erhält. Sobald dies der Fall ist, tritt Luft zu ihm; es erscheint zuerst eine kräftige Oidium-Vegetation und bald darauf stellen sich auch andere Schimmelpilze ein. Dies mußte vermieden werden, wenn wir eine erfolgreiche bakteriologische Prüfung ermöglichen wollten. In den Käsereien erreicht man die Konservierung für den Winter so, daß bei den stark gesalzenen Käsen sowohl auf den Boden als auch auf die Oberfläche der 200—300 und mehr kg Käse enthaltenden Fässer eine dicke Schicht Salz gestreut wird, die das Schimmeln der Käse verhindert. Die Gefahr des Eintrocknens ist in den starkwandigen Eichenfässern in den kühlen Kellern der Käsereien nicht so stark. Für unsere Proben zu je 1 kg resp. bei 5 Untersuchungen zu je 5 kg in den gewöhnlichen Tönnchen aus lose gefügtem Tannenholz, die öfters zur Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung geöffnet wurden und wobei der Käse angebohrt werden mußte, eignete sich die genannte Methode weniger. Wir suchten daher die Konservierung auf einem anderen Wege zu erreichen. Den luftdichten Verschluß, der die genannten Nachteile verhindern sollte, bewerkstelligten wir dadurch, daß wir die Oberfläche der Käse unter dem Deckel mit einer Paraffinschicht bedeckten und die Tönnchen von außen mit Pech überzogen. Monatelang konservierten sich auf diese Weise die Käse vorzüglich; sie blieben frei von Schimmelpilzen und ohne Wasserverlust. Diese Konservierung kam immer sofort nach der ersten Probeentnahme zur Ausführung.

Probeentnahme zur bakteriologischen Untersuchung. Um jegliche Luft und Kontaktinfektion zu vermeiden, entnahmen wir die Proben nach Entfernung eines Teiles der Paraffin- und der unmittelbar unterhalb derselben liegenden Käseschicht durch Einbohren einer auf beiden Seiten offenen Röhre. (Burriröhre für Hoheschichtkultur). Die Röhre wurde vorher an beiden Enden mit Watte verschlossen und in Filtrierpapeir gehüllt sterilisiert. Vor dem Einbohren wurde der eine Wattepfropfen selbstverständlich entfernt, um nach dem Herausziehen wieder eingesetzt zu werden. Die nach dem Herausziehen der Röhre im Käse zurückgebliebene Öffnung füllten wir mit geschmolzenem Paraffin aus, um das Verderben des Käses zu verhüten. Die folgenden Proben entnahmen wir immer in entsprechender Entfernung von der früheren Bohrstelle. —

In der Röhre war zwischen den beiden Wattepfropfen die Infektion der

Käseprobe ausgeschlossen. Verschlossen wir, die abgebrannten Wattepfropfen einwärtsschiebend, überdies die Röhre noch mit 2 gut schließenden Gummipfropfen, so konnten wir die Probe unbegrenzte Zeit hindurch aufbewahren, ohne ein Verderben derselben befürchten zu müssen. Wiederholt bemerkten wir dabei in den Röhren ein Zerreißen des Käses und Verschieben der Teile, wobei sich häufig ein putrider oder Buttersäuregeruch einstellte. Wurde bloß mit Watte verschlossen, so erschien bald Oidium lactis oder andere Fadenpilze auf den den Öffnungen zugekehrten Seiten des Käses.

Verdünnungen. Zur bakteriologischen Untersuchung entnahmen wir den Käse aus den genannten „Proberöhrchen" mit einem sterilen Messer, wogen 0,5 g in ein Freudenreichkölbchen ab und zerrieben dieselben mit einem sterilen Glasstabe. Da der Liptauer eigentlich ein fein gemahlener Käse ist, gelang es so, ein recht gutes „Stamm-Extrakt" zu erhalten, von welchem wir weitere Verdünnungen (0,05 und 0,0005 g in 100—100 cm) bereiteten. Zu den Platten entnahmen wir der letzten Verdünnung die entsprechenden ($^1/_{200}$—$^1/_{2000000}$ Teil der Emulsion) Mengen Kubikzentimeter. Bei frischen, 4—5 Wochen alten Käsen gaben 0,000 00025—0 000 00050 g in der 10. Woche 0,000 000 001 25—0,000 002 50 g, in der 20. 0,000 002 50 bis 0,000 005 g Käse die besten Platten. Von den jüngeren Käsen waren demnach, dem größeren Keimgehalt entsprechend, zehnmal kleinere Mengen notwendig als bei den älteren. Von der pasteurisierten Käseemulsion kam der $^1/_{100}$, $^1/_{20}$, $^1/_{10}$ Teil, entsprechend 0,005, 0,025 und 0,050 g Käse, für die Platten resp. Hoheschichtkulturen zur Verwendung. —

Nährböden. Um quantitativ wie qualitativ zu guten Resultaten zu gelangen, legten wir neben Gelatine und Agar-Plattenkulturen auch Hoheschichtkulturen nach Burri an. Als Nährboden kam bloß bei der ersten Untersuchung des Käses No. 1. Käseextraktagar, sonst immer Pepton-Labmolken-Agar, resp. Gelatine zur Verwendung. Zur Zählung der Säurebildner benützten wir Kreideagar und zur Zählung der peptonisierenden Bakterien Milchagar. Infolge des starken Antagonismus zwischen den Milchsäurebakterien und den aëroben Sporenbildnern kann man letztere auf den Platten nur bei sehr großen Verdünnungen ohne Pasteurisierung des Materials erhalten. Um letztere ebenfalls zu erhalten, legten wir aus 5 Minuten lang bei 85° C oder 10 Minuten lang bei 80° C pasteurisierten Käseextrakt-Platten und zur Züchtung der anaëroben Sporenbildner Burris Hoheschicht-Agarkulturen an. Wie wir sehen werden, bewährte sich diese Methode auch bei uns vorzüglich zur Züchtung von Anaëroben.

Zusammengefaßt, gossen wir also bei jeder Analyse aus dem nicht pasteurisierten Material 1 Agar- und 1 Gelatineplatte, 2 Kreide- und 2 Milchagarplatten, weiter 2 Agar-Hoheschichtkulturen nach Burri, von dem pasteurisierten Käseextrakt 1 Gelatine- und 1 Agarplatte und 2 Agar-Hoheschichtkulturen. Zur Bestimmung der morphologischen und biochemischen Eigenschaften züchteten wir die isolierten Mikroben außer auf den Standardnährboden auch in mehreren spezifischen Nährlösungen.

Für die Vergärung der 3 Zuckerarten Dextrose, Laktose, Saccharose benutzten wir weiter Glyzerin in der von O. Jensen[1]) angegebenen Nährlösung in gewöhnlichen Reagensgläsern, bzw. in Gärröhrchen. Die Säurebildung bestimmten wir mit Lackmuspapier. Dieselbe Nährlösung ohne Zuckerzusatz diente zur Prüfung auf Amylase. Nachdem sich kräftige Entwickelung in der Nährlösung gezeigt hatte (7—10 Tage), gaben wir 1 ccm mit Thymol konservierten Stärkekleister hinzu, stellten die Lösung 12 Stunden bei 30° C hin und prüften dann nach Fehling.

---

[1]) Molkereizeitung. Jg. 1909. p. 374. Anm. 4.

Als gute Differenzierungsmethode erwies sich die Prüfung auf Nitratreduktion in einer Nährlösung von 1000 ccm Wasser, 10 g Pepton und 1 g Kaliumnitrat. Auf Nitrite prüften wir am fünften bis achten Tage nach Grieß. In der Hälfte der eben genannten Nährlösung prüften wir nach Nessler auf Ammoniak.

Auf Indol (nach 14 Tagen) und H_2S prüften wir in den Bouillonkulturen, nach ersteren mit Ehrlichs-Reagens, nach letzteren mit Bleiazetatpapier.

Das Fettspaltungsvermögen bestimmten wir bei den Aëroben nach der Eijkmanschen Methode, bei den Anaëroben in Reagensgläsern, deren Wandung mit einer dünnen Talgschicht überzogen wurde und in die dann der sterile Nährboden hineingegossen wurde. Es ist dies dieselbe Methode, die wir bald nacher bei Söhngen[1]) beschrieben fanden.

IV. Vorgehen bei der Bestimmung der isolierten Mikroben.

Wir begnügten uns nicht bloß mit der Gruppierung der isolierten Mikroben nach gewissen Eigenschaften, sondern versuchten auch, so weit es heute möglich ist, eine Bestimmung der einzelnen Spezies. Unser Ziel war, einerseits zu der ja noch sehr des Ausbaues bedürftigen Systematik einen Beitrag zu liefern, andererseits glaubten wir, nur auf diese Weise zu erreichen, daß gewisse Arten oder Formen, die sich eventuell im Liptauer Käse vermehren, und mit deren Gegenwart oder Fehlen die Reifung, besonders was das Scharfwerden anbetrifft, im Zusammenhang steht, unserer Aufmerksamkeit nicht entgingen.

Bei der Speziesbestimmung der Mikroben benutzten wir folgende Werke: Die „Milchsäurebakterien“, einschließlich Mikrokokken, Streptokokken, Bakterien bestimmten wir nach Löhnis[2]) Schlüssel, der heute wohl der beste ist. Bei anderen Mikroben versuchten wir die Speziesbestimmung nach Lehmanns und Neumanns[3]) bekannter klassischer „Diagnostik“, zogen aber manchmal auch Conns „Klassifikation“[4]) zu Rat. Reichten diese nicht aus, so war mit Chester[5]) und Matzuschita meist auch nicht viel anzufangen, da die Beschreibungen viel zu wenig vollständig sind.

Die Bestimmung der aëroben Bazillen ist heute keine leichte Aufgabe. Einerseits sind sie bekanntlich hinsichtlich ihrer morphologischen Eigenschaften noch mehr variabel als andere Mikroben, andererseits weichen sie in den allgemein geprüften Eigenschaften, wie Beweglichkeit, **Gram**färbung, Peptonisation, Indolbildung, H_2S, Verhalten in Milch usw. (Siehe „Vorbemerkung“ in Lehmann und Neumann, Diagnost, p. 436) meist nicht voneinander ab. Lehmann und Neumann schreiben selbst (p. 433) in ihrem Schlüssel: „Hier muß darauf hingewiesen werden, daß trotz sorgfältigsten Studiums letzterer Arten und vielfacher Durcharbeitung derselben ganz sichere, für die einzelne Art typische Angaben nicht immer gemacht werden konnten, da mehrere Arten oft außerordentlich variieren und vielfach einander so nahe stehen, daß man sie ohne Mühe nicht auseinander halten kann.“

---

[1]) l. c.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 18. 1907. p. 97; Handb. d. landw. Bakteriologie. 1910 u. Landw. bakt. Praktikum.

[3]) Ausg. 1912.

[4]) Storrs Agr. Exp. Sta. 18 th. Ann. Report. 1906.

[5]) Manual of determ. Bacteriology. 1909.

Arth. Meyer und dessen Schüler suchten, durch besondere Methoden Ordnung unter die aëroben Bazillen zu bringen, und wir verdanken ihnen vieles, was wir heute über diese Gruppe wissen. Leider sind die Angaben für den, der auf dem allgemein bei der Beschreibung von Bakterien eingeschlagenen Wege geht, nur zum kleinen Teil verwertbar und zum Teil sind die Methoden bei floristischen Studien nur schwer anzuwenden.

Um also die Speziesbestimmung etwas zu erleichtern, arbeitete der eine von uns (Vas) folgende, von Král erhaltene Sporenbildner nach unseren Methoden durch: Bac. mycoides, B. sphaericus, B. Ellenbachensis, B. carotarum, B. robur, B. simplex, B. subtilis, B. butyricus, B. tumescens, B. luteus sporogenes, B. silvaticus, B. petasites, B. vulgatus, B. mesentericus, B. graveolens, B. fusiformis, B. teres, B. lidermos, B. pumilus, B. asterosporus, B. leptodermis, B. oxalaticus.

Durch direkte Vergleichung mit den von Král erhaltenen Stämmen und durch Vergleichung der Angaben mit unseren Stämmen versuchten wir die Bestimmung der in den Liptauer Käsen vertretenen aëroben Bazillen, die einst als wichtige Käsereifungserreger angesehen wurden und von mancher Seite noch heute als solche betrachtet werden. Unser Ziel war auch hier, die Systematik der Bakterien zu fördern und den beliebten Namen „Heu-, Erd-, Kartoffel-Bacillus“ zu umgehen. Wie weit uns dies gelungen ist, überlassen wir der Beurteilung anderer. So viel wollen wir jedoch sagen, daß die Prüfung auf Amylase, Nitratreduktion, mehr oder weniger auch die Säurebildung aus Zucker und Glyzerin und die Fettspaltungsfähigkeit meist wertvolle Anhaltspunkte für die Unterscheidung derselben geben, wertvollere als z. B. die Prüfung auf die, fast ausnahmslos vorhandene Fähigkeit zur Gelatine- und Kaseïnhydrolyse, die bei der Bestimmung anderer Mikroben so wichtige Unterscheidungsmerkmale bilden.

Daß der Speziesbestimmung heute noch große Schwierigkeiten im Wege liegen, ist bekannt und auch die Gründe hiefür. Vieles könnte jedoch gebessert werden, wenn bei der Beschreibung von Mikroben mehr Einheitlichkeit bezüglich der verfolgten Methoden, der angewandten Nährböden, Nährlösungen und der Reaktion derselben, der Beobachtungszeiten wie auch der genauen Beschreibung der Termini usw. herrschen würde, als dies bisher der Fall ist. Solche nachahmenswerte und in Europa noch wenig beachtete Bestrebungen finden wir bei den Bakteriologen der Vereinigten Staaten. Die „American Public Association“ hat genaue Vorschriften für die Bereitung von Nährböden herausgegeben und die „Society of American Bacteriologists“ bereits 1905 die beim Studium und der Beschreibung von Bakterien im Auge zu behaltenden Prinzipien festgesetzt. Wir haben die Vorschriften der Amerikaner bei unseren Untersuchungen mit Vorteil benützt[1]).

Im folgenden geben wir nun die Beschreibung der aus den untersuchten Liptauer Käsen gezüchteten Bakterien. Wie aus denselben ersichtlich, ist dies, soweit es sich um mehr oder weniger beschriebene Mikroben handelt, zugleich ein Beitrag zur näheren Kenntnis derselben sowohl in morphologischer als besonders auch in biochemischer Hinsicht. Durch Prüfung der Vergärbarkeit der Dextrose, Laktose, Saccharose und des Glyzerins, Prüfung auf Amylase, Lipase, Nitratreduktion erweiterten wir die Kenntnisse über die beschriebenen Mikroben. Von jedem Mikroben führten wir ein „Protokoll“, in welchem die zu beobachtenden Eigenschaften bereits vorgedruckt waren.

---

[1]) Vergleiche Harding und Prucha, New York Agr. Exp. Stat. Geneva. Tech. Bull. No. 8. p. 139; hier auch Literaturangaben, zweitens Russel and Hastings Experimental Dairy Bacteriology. Boston.

V. Beschreibung der Mikroben aus den untersuchten Käsen.

Mikrokokken.

Micrococcus pyogenes Rosenb. (M. lactis acidi).

I. 1, IV. 1, III. 1, orange.
I. 2, II. 2, III. 2, IV. 2, V. 2, weiß.
I. 3, IV. 3, zitronengelb.

Kokken, meist über 1 µ groß, einzeln oder zu zweit und in unregelmäßigen Gruppen, alle unbeweglich, keine Kapsel, nach Gram färbbar.

Agarplatte: Wachsen gut. Form der Kolonien meist flach, terrassenartig, in der Mitte häufig eine Warze (Brustwarzenform), oder flach konvex, glänzend, glatt, Rand ganz selten etwas gelappt.

Agarstrich: Wachstum gut, Belag flach, glänzend, glatt, ein Stamm ist immer matt und rauh, oft gefaltet (mesentericus artige Falten). Farbe orange, zitronengelb und weiß. Konsistenz meist butterartig, oft jedoch auch häutig oder schleimig-zäh. Geruch unbestimmt, selten aromatisch (Erdbeergeruch).

Gelatinestich: Oberflächenwachstum meist gut (am wenigsten noch bei den weißen Stämmen) oft, so bei matten Stämmen, ganz kräftige, gefältelte Haut. Im Stichkanal nur schwacher, nach unten sich verdünnender Faden. (Bei einem weißen Stamme Ästchenbildung.) Verflüssigung bei allen Stämmen vorhanden, jedoch von verschiedener Energie; zuerst schalen- dann trichterförmig, endlich zylindrisch. Bei einzelnen (am häufigsten bei den weißen) finden wir selbst nach 6 Wochen nur einen kleinen Verflüssigungstrichter, andere sind zum ¼ bis ½ Teil zylindrisch verflüssigt.

Peptonmolken: Meist diffus getrübt, klärt sich jedoch später, starker, flockiger bis fadenziehender Bodensatz, selten Ringbildung und bei 2 Stämmen (weiße) matte Hautbildung.

Bouillon: Wie in Peptonmolken.

Kartoffel: Meist reicher Belag. Flach oder flach konvex, erhabenes Band, mattglänzend, glatt oder gekörnt. (Der matte Stamm gefältet). Einmal wird die Kartoffel gebräunt. Sonst wie Agar. —

Milch: Gerinnt meist vor dem Beginn des Peptonisierens, oft jedoch erst nachher. Reaktion immer sauer. Die Auflösung des Kaseïns kann manchmal ausbleiben, was nach einigen diesbezüglich angestellten Versuchen mit der Säurungsintensität im Zusammenhang zu stehen scheint. Bei schnell säuernden Stämmen, besonders bei 30°, wo die Säurebildung intensiver ist, bleibt die Kaseïnhydrolyse oft aus; es tritt nur Gerinnung ein. Offenbar ist die Casease nur bis zu einem gewissen Säuregrade wirksam.

Biochemisches Verhalten: Dextrose und Laktose vergären alle zu Säure, bis auf zwei Stämme ebenfalls Saccharose. Aus Glyzerin bei 5 Stämmen keine Säure, sonst immer. Nitrate werden von 3 Stämmen zu Nitrit reduziert, jedoch nicht bis zu Ammoniak; keine Amylase; Lipase bei einem orange Stamm. (Gedeihen meist nicht auf Eijkmans Rinderfettagar). Kein H_2S und Indol. Farbstoff: Bei demselben Stamme ist die Intensität der Farbe sehr wechselnd; bei einzelnen Stämmen ändert sie sich im Laufe der Generationen; weiße werden gelblich, gelbe orangefarben und umgekehrt. Bei einem Stamme sahen wir zu verschiedenen Zeiten in verschiedenen Kulturen alle 3 Farben.

Speziesbestimmung: Die Kokken gehören offenbar zum Typus[1]) des Micrococcus pyogenes Rosenbach, die orangegefärbten Stämme zu Micr. pyogenes aureus, die weißen zu Micr. acidi lactis Krüger (M. pyog. alb.), der weiße Ästchen bildende M. radiatus, die gelben Micr. luteus (M. pyog. β citreus).

Micrococcus lactis acidi Marpm.

I. 5, III. T, IV. T. weiß.
I. 4, II. 4, III. 4, IV. 4, V. 4. zitronengelb.
I. 6, III. 6. orange.

---

[1]) Vergl. Löhnis, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 18. 1907. p. 140; Handb. d. landw. Bakteriol. 1910; Landw. bakt. Praktikum.

Kokken von durchschnittlich 1 μ, einzeln oder zu zweien, Semmelformen, Tetraden und unregelmäßige Gruppen. Alle unbeweglich, ohne Kapsel und Gram-positiv.

Agarplatte: Die Kolonien wachsen gut; Durchmesser 0,5—1 cm, meist rund, flach, mehr oder weniger konvex, häufig brustwarzen- oder nabelförmig; Oberfläche glatt, manchmal etwas gekörnt. Meist ganzrandig, jedoch auch gelappt oder gezähnt. (Ein Stamm mit gefältelter Kolonie.) Weiß, zitronengelb und orange.

Agarstrich: Mäßiger Belag, besonders bei den weißen Stämmen oft nur durchsichtig schleierartig, aus nicht zusammenhängenden Kolonien bestehend. Bei den anderen bandförmig, flach oder etwas konvex, der Rand etwas gewellt. Glänzend, glatt, bis auf 1 Stamm, dessen Agarbelag gefältelt war. Konsistenz meist streichbar, bei einigen Stämmen aber schleimig-hautartig oder trocken-bröselig, ändert sich jedoch.

Gelatinestich: Die weißen und orangegefärbten Stämme auf der Oberfläche nur mäßig gut, die gelben besser. Im Stichkanal wachsen alle gut, häufig als knotiger Faden oder perlenschnurartig. Verflüssigung fehlt bei allen.

Peptonmolken und Bouillon: Diffuse Trübung und flockiger oder fadenziehender Bodensatz in größerer oder geringerer Menge. (Bei dem faltenbildenden Stamme Ringbildung.)

Kartoffel: Die weißen und orangefarbigen Stämme wachsen meist auch auf Kartoffel schlechter, in Form eines schmalen, flachen Bandes, oder schleierartig, die gelben stark erhaben und viel reichlicher; Rand gewellt. Die Oberfläche glänzend, meist gekörnt, oft auch reliefartig uneben. (Der erwähnte 1 Stamm in Falten.)

Milch: Es erfolgt äußerst langsam eine Säuregerinnung. Sehr selten erfolgt dies schon in einigen Tagen, meist ist die Milch selbst nach 14—20 Tagen nur am Boden des Reagensglases geronnen. Nach 14 Tagen gerinnt sie jedoch schon meist beim Aufkochen, oft ist jedoch dafür auch dann noch nicht genug Säure vorhanden; die Reaktion ist aber immer deutlich sauer. Eine Kaseïnhydrolyse erfolgt nie.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Saccharose, Laktose wird von allen Stämmen Säure gebildet, aus Glyzerin häufig. Nitratreduktion bei 5 Stämmen (kein Ammoniak).

Amylase, Lipase, Indol nicht vorhanden, hingegen häufig H_2S.

Farbstoff: Bei den gelben Stämmen ist die Farbe bald heller (graugelb), bald tiefer getönt. Der eine auf Agar orangefarbene Stamm ist auf Kartoffel oben gelb, unten weiß.

Luftansprüche: Facult. anaërob. (Gutes Wachstum im Stichkanal, Milchgerinnung von unten nach aufwärts.)

Speziesbestimmung: Gehört offenbar zum Typus Micr. lactis acidi Marpmann.

Die weißen zu Micr. lact. acidi Leichm.,
die gelben zu Micr. lactis acidi Marpmann.
Die orangefarbigen zu Micr. umbilicatus Weiß.

Micrococcus cremoides Zimmermann.

III. 7, IV. 7, V a. 7.

Kokken durchschnittlich 1 μ groß, häufig Kaffeebohnenformen, Tetradenbildung und in Gruppen; nicht beweglich, ohne Kapsel; nach Gram färbbar.

Agarplatte: Schnell wachsende, große Kolonien, im Durchmesser 8—10 mm rund, flach oder brustwarzenförmig erhaben, Rand gewellt oder gelappt, seichte Ringbildung auf der Oberfläche.

Agarstrich: Reichlich, Rand unregelmäßig, flach konvex, glänzend, glatt, zitronengelb; Konsistenz butterartig.

Gelatinestich: Breitet sich auf der Oberfläche aus, im Stichkanal feiner Faden. Anfangs schalenförmige, später zylindrische Verflüssigung, sehr langsam.

Bouillon: Getrübt, fadenziehender Bodensatz.

Kartoffel: Wächst sehr gut. Breites Band mit gewelltem Rand, matt glänzend, zitronengelb, gekörnte oder reliefartige Oberfläche, Konsistenz butterartig. Ein Stamm bräunt die Kartoffel.

Milch unverändert.

Biochemisches Verhalten: Ein Stamm vergärt Dextrose zu Säure, die anderen greifen weder Zucker, noch Glyzerin an. Amylase, Indol, Nitratreduktion, Ammonia, H_2S nicht vorhanden; Lipase bei einem der Stämme nachweisbar.

Speziesbestimmung: Gehört zum Typus des Micr. cremoides; da Farbe gelb, daher wohl Micr. chromoflavus Huss.

Micr. candicans Flügge.

II. 8, III. 8, Va 8, Vb 8, weiß. Va 10 dreifarbig.

II. 9, III. 9, Va 9, Vb 9, gelblichweiß. I. 12, II. 12, IV. 12, orange. III. 11, IV. 11, gelb.

Meist große (über 1 μ) Kokken, selten einzelne Stämme kleiner, in Gruppen, Tetraden und zu zweit; unbeweglich, ohne Kapsel; nach Gram meist gut färbbar.

Agarplatte: Mehr oder weniger gut wachsende, runde, brustwarzenförmige, flachkonvexe bis flache Kolonien, ganzrandig oder etwas gekerbt, gelappt. Bei einigen Stämmen rosettenartig oder gekörnelt.

Agarstrich: Wachstum mäßig gut, flach, kaum erhaben, bandförmig, glänzend glatt, manchmal gekörnelt; Konsistenz butterartig; bei 2 gelben Stämmen reliefartige Oberfläche, oft häutig und in Falten gelegt. (Farbe siehe unten.)

Gelatinestich: Wachstum schlecht; nur spärlich auf der Oberfläche, in der Tiefe fast gar nicht. Keine Verflüssigung.

Bouillon: Mehr oder weniger getrübt, später klar; selten sandiger, meist aber fadenziehender Bodensatz.

Kartoffel: Wachstum mäßig, jedoch besser als auf Agar, flach erhaben, glatt oder auch gekörnelt; bei 1 Stamm Faltennetz.

Milch: Unverändert.

Biochem. Verhalten: Bis auf 1 Stamm bilden alle aus Dextrose Säure, einige auch aus Saccharose und Glyzerin (siehe Tabelle I); Laktose wird nicht angegriffen; Nitrate reduziert 1 Stamm, die anderen nicht; Amylase, Indol, H_2S, Ammonia nicht vorhanden; Lipase bei 4 Stämmen. Farbe weiß, gelblichweiß, schwefelgelb, orangefarbig, weiß, gelb, graubraun, gefleckt, dreifarbig, wechselt bei einigen Stämmen, ähnlich wie bei anderen Kokkenarten.

Speziesbestimmung: Gehört auf Grund der fehlenden Milchzuckervergärung (Milchgerinnung) und Gelatineverflüssigung zum Typus des Micr. candicans Flügge. Näher bestimmt, wären die weißen Varietäten Micr. candicans Fl., die gelbweißen, mit rosettenförmigen Kolonien Micr. rosettaceus, die dreifarbigen Micr. versicolor, die gelben Micr. sulfureus, die orangefarbign Micr. aurantiacus.

III. 13, V b 13.

Durchschnittlich 1 μ große Kokken, einzeln oder in unregelmäßigen Gruppen, unbeweglich, keine Kapsel, Gram negativ.

Agarplatte: Wachstum mäßig; runde, scheibenförmige, flache Kolonien mit glatter oder punktierter Oberfläche, ganzrandig oder etwas gewellt.

Agarstich: Mäßiges Wachstum, bandförmig, flach, glänzend, glatt, blaßrot-rosarot; Konsistenz butterartig.

Gelatinestich: Wenig ausgebreitet auf der Oberfläche, im Stich feiner Faden. Ganz kleine Verflüssigungsschale nach 6 Wochen.

Bouillon diffus getrübt; gelblicher, fadenziehender Bodensatz.

Kartoffel: Wächst kaum sichtbar.

Milch: Unverändert.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose Säure, aus Laktose, Saccharose und Glyzerin nicht; Nitrate werden nicht reduziert; Amylase, Fettspaltung, Indol, Ammonia, H_2S nicht vorhanden.

Speziesbestimmung: Rötlich bis rot auf Agar, unbeweglich, daher Micr. roseus Bumm. L. et N.

I. 51, II. 51, III. 51.

Sarcinaformen. Die einzelnen Zellen über 1 μ groß, unbeweglich, ohne Kapsel; Gram positiv.

Agarplatte: Rundliche, 3-6 mm große, konvexe oder flache, glatte, ganzrandige oder etwas gekerbte Kolonien.

Agarstich: Wächst gut, flach, glatt (bei 1 Stamm Faltenbildung), glänzend, mit gewelltem Rand, hell oder saftig zitronengelb.

Gelatinestich: Mäßiges Oberflächenwachstum, im Stich keines oder sehr geringes. Verflüssigung mehr oder weniger energisch; bei 1 Stamm fehlt dieselbe.

Bouillon meist diffus getrübt, später klar, mit sandigem, flockigem oder auch fadenziehendem Bodensatz. Bei 1 Stamm Ring-, später Hautbildung.

Kartoffel: Wächst mäßig gut als flacher, etwas erhabener, glatter oder höckeriger, fein gekörnter Belag; glänzend, später matt, zitronengelb.

Milch bleibt unverändert, auch nach der Kochprobe, bis auf den gelben Bodensatz.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle I.

Biochemische Eigenschaften der verschiedenen Mikrokokken-, Sarcina- und Streptokokken-Stämme.

Bezeichnung	Name	Dextrose	Laktose	Milchgerinn.	Saccharose	Amylum	Fett	Glyzerin	Gelatine	Kasein	Nitrat	Ammonia	Indol	H_2S	Farbe	Bemerkung
		Spaltung										Produktion				
1. Typus	Micr. pyog. Rosenb. M. pyog. α aureus															
I. 1a	„ „ „	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—	—			Später glatt, glänzend grau m. orange Ins.
1b		+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	.	orang.	Faltig matt, eine Zeit grau.
III. 1a	„ „ „	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	.	„	Gelb, orange, grau
1b		+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	.		Orange, bald grau
IV. 1	„ „ „	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—	.	„	Häutig
	M. acidi lact. Krüg. (M. pyog. γ albus)															
I. 2	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	.	weiß	
II. 2a	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	+	—	.		Häutig
2b		+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	Spur	—	.	„	
III. 2a,b	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	.	„	gelbl. bei 20°
2c										+						
IV. 2	„ „ (M. radiat.)	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—	.	„	Ästchenbildend
V. 2	„ „ „ „	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	.	„	Häutig
	M. luteus (L. et N.) (M. pyog. β citreus)			.												
I. 3	„ „ „ „	+	+	—	+	—	—	+	+	+	+	.	—	—	schw.-gelb	Später farblos
IV. 3	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	+	—	—	.	—	.	zitr.-gelb	
2. Typus	M. lact. ac. Marpm. M. lact. ac. Leichm.															
I. 4a	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—			
4b	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	—	—	+	weiß	
II. 4	„ „ :, „	+	+	+	+	—	—	Spur	—	—	—	—	—	Spur	„	Die Milch gerinnt nur bei der Kochprobe
III. 4	:, „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	—	—	Spur	—	—	+	„	
4a IV. 4b	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	„	
4c		+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	Spur		
Va. 4	„ „ „ „	+	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	„	
	M. lact. ac. Marpm.															
I. 5a																Häutig
5b	„ „ „ „	+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	blaß gelb	
5c																Graugelb
III. 5	„ „ „ „	+	+	—	+	—	—	+ Spur	—	—	+	—	—	.	„	Stich in Orang.
IV. 5a	„ „ „ „	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	lebhaft gelb	
5b	„ „ „ „	+	+	—	+	—	—	+	—	—	+	—	—	+		
	M. umbilicatus Weiß															
I. 6	„ „ „	+	+	+	+	—	— w. n.	+	—	—	—	—	—	—	orang.	w. n. = wächst nicht
III. 6	„ „ „	+	+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	„	

Tabelle I (Fortsetzung).

Bezeichnung	Name	Dextrose	Laktose	Milchgerinn.	Saccharose	Amylum	Fett	Glyzerin	Gelatin	Kasein	Nitrat	Ammonia	Indol	H_2S	Farbe	Bemerkung
		Spaltung										Produktion				
3. Typus	Micr. cremoides M. chromoflavus															
III. 7	„ „	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	gelb	
V. 7	„ „	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	„	
4. Typus	Micr. candicans M. candicans															
III. 8	„ „	+	—	—	+	—	— w. n.	+	—	—	+	—	—	—	weiß	
III. 8a 8b	„ „	+	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	„	Übergänge zu M. rosettaceus
Va. 8 Vb. 8	„ „ „ „	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	„	Wird hell orang.
	M. rosettaceus															
II. 9	„ „	—	—	—	—	—	— w. n.	+	—	—	—	—	—	—	grau-gelb	
III. 9	„ „	+ Spur	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	„	Übergang zu M. sulfureus
Va. 9 Vb. 9	„ „ „ „	+	—	—	—	—	— +	—	—	—	—	—	—	—	„	Gelblich Weiß
	M. versicolor															
V. 10	„ „	+	—	—	—	—	— w. n.	—	—	—	—	—	—	—	drei-farbig	Grau, ocker-gelb u. braun
	M. sulfureus															
III. 11	„ „	+	—	—	—	—	— w. n.	—	—	—	—	—	—	—	gold-gelb	Häutig, gefältelt
IV. 11	„ „	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	„	
	M. aurantiacus															
I. 12	„ „	+	—	—	+	—	w. n.	—	+	—	—	—	—	—	orang.	
II. 12a	„ „	+	—	—	+	—	— +	—	—	—	—	—	—	—	„	
12b		+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—		
IV. 12	„ „															
	Micr. roseus															
I. 13	„ „	+	—	—	—	—	— w. n.	—	—	—	—	—	—	—	rosa-rot	
13	„ „	+	—	—	+ Spur	—	—	+	—	—	—	—	—	—		
	Sarcina: Sarcina lutea															
I. 51	„ „	—	—	—	— alkal.	—	—	—	—	—	+	—	—	—	gelb	
II. 51	„ „	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	„	
III. 51	„ „	—	—	—	—	—	—	+ Spur	—	—	—	—	—	—	„	
	Streptococcus: Streptoc. lactis L.															
I.																
II. 151																
III.		+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
IV.	„ „ „	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	grau	
Va. a-v		+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
Vb.		+	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—		

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Laktose, Saccharose wird keine Säure gebildet; Glyzerin spalten 2 Stämme; Nitrate reduziert 1; H_2S bei 2 in Spuren; Indol, Ammonia, Amylase, Lipase nicht vorhanden.

Offenbar Sarcina lutea (Flügge) Lehm. et Stbth., obwohl wir niemals eine Gerinnung der Milch konstatieren konnten, wie dies bei L. et N. angegeben ist.

Streptokokken.

Streptococcus lactis Lister.

I, II, III, IV, Va, Vb 10/a—r.

Über Strept. lactis (Lister) Lhs. oder Bact. lactis acidi Leichm. bemerken wir nur folgendes: Die häufigste Form, die wir zu Gesicht bekamen, ist die Doppelform mit zugespitzten Enden, darunter selten Formen von kurzen, 6—7-gliedrigen Ketten. Milch brachten fast alle nach 24—48 Stunden zur Gerinnung, bloß einige auch nach längerer Zeit nur am Boden des Reagensglases. Aus Dextrose, Laktose und Saccharose bildeten fast alle Stämme Säure; am häufigsten fehlte das Säurebildungsvermögen in Saccharose. Glyzerin wurde nur ausnahmsweise gespalten (von 22 Stämmen 3).

Bakterien.

Bact. casei Leichmann.

I, II, III, IV, Va, Vb, 151a—h.

Die Form unserer Milchsäure-Langstäbchen erwies sich als äußerst variabel. Selbst der sonst bei Bakterien konstantere Breitendurchmesser kann sich bei demselben Stamme ändern, indem man bald kräftigere (1,2 μ), bald schlankere, bis zu 0,5 μ dünne Stäbchen vor Augen bekommt. Die Länge schwankt von 1,5—20 μ und länger. In demselben Nährboden sehen wir denselben Stamm einmal aus schlanken, langen, einmal aus kurzen, dicken Zellen bestehen. So sehr ändern sich Form und Maße, daß man geneigt wäre, denselben für einen anderen Stamm zu halten. So finden wir z. B. bei einem Stamme, der aus der Kolonie der Burri-Röhre gefärbt, aus langen, schlanken, geraden oder nur wenig gekrümmten, an Bact. casei ε erinnernden Stäbchen besteht, in Peptonmolken stark verkürzt, hier und da ganz kurze, in Teilung begriffene Zellen, die an Bact. lactis acidi erinnern, nur sind die Enden scharf abgeschnitten. Derselbe Stamm wächst in Milch zu langen, sich schlängelnden Fäden aus, neben welchen man einzelne kürzere und längere Stäbchen sehen kann. Fäden findet man zumeist in alten Milchkulturen. Oft findet man neben Stäbchen auch lange Ketten aus regelmäßigen, schlanken, feinen Gliedern, oft aber auch solche, in welchen neben 4—5 μ langen sehr kurze, sogar fast kokkenförmige Zellen in einer Kette vorkommen. Wir sehen Ketten, in welchen lange und kürzere Stäbchen mit kokken- und diplokokkenförmigen (Teilungsformen) Zellen zusammenhängen. Manche Stämme bilden mit Vorliebe lange Ketten, bis zu 40 μ und länger. Wieder finden sich Stämme, die selbst nach wiederholtem Umzüchten in ganz frischen Kulturen aus korkzieherförmigen, kommaförmig gebogenen und geknickten „Involutionsformen“ bestehen, wie sie Troili-Peterson[1]) als Bact. curvatum beschrieben hat.

Wichtige, konstante, charakteristische Unterschiede betreffend die kulturellen und biochemischen Eigenschaften konnten zwischen den isolierten Stämmen, soweit sich unsere Untersuchungen erstreckten, nicht gemacht werden. Daher ziehen wir das von 42 Stämmen (aus 5 Käsen, 18 Untersuchungen) erhaltene Material zusammen und geben im folgenden die weitere Beschreibung der Milchsäurelangstäbchen des Liptauers.

Burriröhre: Die Kolonien von 2—3 mm Durchmesser sind glatt, linsenförmig und verschwinden bald infolge der Trübung des Agars. Stechapfelförmige Kolonien bildete 1 Stamm, verlor jedoch diese Eigenschaft später, die übrigens nach unseren Beobachtungen auch sehr von der Konsistenz der Agarmasse abhängig ist; in weichem Agar bilden sich solche leichter.

Agarplatte: Die Oberflächenkolonien wachsen äußerst langsam, sind rund, haben 0,5—1—2 mm im Durchmesser, sind glattrandig oder etwas gezähnt, konvex oder brustwarzenartig, amorph, undurchsichtig oder bläulich durchscheinend und von den Kolonien des B. lact. acidi kaum zu unterscheiden.

Agarstrich: Schlechtes Wachstum in Form schleifenförmiger, hier und da zusammenhängender, glatter, glänzender, grauer oder weißlichgrauer, bläulich durchscheinender, oft kaum sichtbarer Kolonien. Im Kondenswasser oft recht kräftiges Wachstum.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. II. p. 120.

Agarstich: Kräftiger charakteristischer Faden, manchmal ist derselbe knotig. Auf der Oberfläche selbst nach Wochen kaum ein Wachstum, jedoch kräftig im Kondenswasser· Der Agar trübt sich.

Gelatinestich: Auf der Oberfläche kein oder höchstens unbedeutendes Wachstum; Stich kräftig; knotige Fäden oder perlschnurartig, manchmal eine Kette nicht zusammenhängender Kolonien, selten fadenförmig.

Peptonmolken: Anfangs diffuse, später flockige Trübung und flockiges Sediment; später Molken geklärt. Die Flocken bestehen zumeist aus aus dem Nährboden ausgeschiedenen eiweißartigen Stoffen, aber nicht aus Zellen. Bei einzelnen Stämmen reichlicher, fadenziehender Bodensatz.

Bouillon: Keine Entwicklung, höchstens eine Spur von Bodensatz.

Kartoffel: Entweder gar kein oder sehr schwaches Wachstum in Form eines glänzenden, flachen, grauweißen, kaum sichtbaren, schleimigen, schleierartigen Belages.

Milch: Alle Stämme säuern äußerst langsam; nur ausnahmsweise tritt bei 30° C schon vor dem 5. Tage Gerinnung ein, meistens ist dies erst nach 7—8 Tagen der Fall. Bei höheren Temperaturen tritt die Gerinnung auch nicht schneller ein. Zuerst gerinnt die Milch am Boden und verbleibt oft so, zumeist schreitet die Gerinnung jedoch langsam nach aufwärts vor. Das Gerinnsel ist meist fest und homogen, seltener weich. Bei fadenziehenden Stämmen verliert sich diese besondere Eigenschaft und nach einigen Überimpfungen erhalten wir ein festes, leberartig brechendes Gerinnsel.

Biochemische Eigenschaften: Die drei Zuckerarten werden von den meisten der untersuchten Stämme vergoren.

Dextrose: Säure ohne Gas nur bei 7 Stämmen nicht. (Bei 3 die Prüfung wiederholt.) Es sind dies alle 3 sehr dünne Stäbchen, die ganz lange Ketten (*Streptobacterium*) bilden.

Saccharose: Säure ohne Gasbildung, fehlt bei 12 Stämmen (zum Teil keine Entwicklung, auch nach wiederholtem Impfen).

Laktose: Säure ohne Gas bei allen Stämmen, 2 ausgenommen, bei denen sich in Agarstichkultur auch Gasbildung zeigt. Diese Eigenschaft geht jedoch bald verloren, und dann besteht kein Unterschied mehr, der die Stämme von anderen unterscheidet.

Glyzerin wird nur von 5 Stämmen gespalten, meist fehlt auch nach wiederholtem Impfen die Entwicklung in den Röhrchen.

Calc. lactat. Mit 13 Stämmen versuchten wir die Vergärung von milchsaurem Kalk. 3 Stämme entwickelten sich schwach, 4 gar nicht, die anderen kräftig, ohne jedoch Calc. lactat anzugreifen.

Die anderen biochemischen Eigenschaften, auf die wir überall zu prüfen pflegten, fehlen.

Temperaturansprüche. Ein Teil der heute bekannten Lactobacillen ist thermophil (Optimum 42° C) und gedeiht nicht oder kaum bei Zimmertemperatur, so *Bact. casei ε*, *Bact. bulgaricum*, *Bact. Mazun* und andere. Es sind dies zugleich kräftige Säurebildner, die die Milch bei der genannten Temperatur binnen 24—48 Stunden zum Gerinnen bringen. Unsere Lactobazillen aus dem Liptauer Käse gehören, wie *Bact. lebenis*, *Bact. caucasicum*, zu den auch bei Zimmertemperatur gedeihenden und sind zugleich, wie wir oben gesehen, ebenso langsame Säurebildner wie die eben erwähnten aus Leben und Kefir. Alle unsere Stämme entwickelten sich in Peptonmolken-Gelatine-Stichkulturen bei 20° sehr kräftig . Bei 30° ist ihr Wachstum jedoch schneller und immer besser wie bei 38° C. Bei 42° erfolgt von 14 hierauf geprüften Stämmen bei 1 nach 4, bei 1 nach 8 Tagen komplette Gerinnung, bei 4 Stämmen ist die Milch nach 10 Tagen erst in der Kuppe des Reagensglases geronnen; die übrigen sind noch flüssig.

Hitzebeständigkeit: Wiederholt fanden wir Lactobazillen-Kolonien auf den Platten, resp. in den Hoheschichtkulturen von der 5 Minuten auf 85° erhitzten Käseemulsion. Die Hitzebeständigkeit der Lactobazillen ist ja bekannt, doch wird die genannte Temperatur gewiß nur so ertragen, daß die in den Käseteilchen eingeschlossenen Bakterien gewissermaßen von einer Isolierschicht umgeben sind.

Speziesbestimmung: Ein Vergleich mit den bislang beschriebenen langen Milchsäurelangstäbchen führt zu dem Ergebnis, daß dieselben mit *Leichmanns Bact. casei* I—II und *Freudenreichs Bact. casei* *a*, die ja identisch sind, völlig übereinstimmen.

Unsere „schleimbildenden“ und „gasbildenden“ Stämme, die nach *Löhnis*’s Einteilung der Milchsäurebakterien zu dem 5 Typus (schleimbildend) und 1. Typus *Bacillus casei* von *Freudenreich* der Gruppe *Bacillus caucasi-*

cus v. Frdrch. gehören würden, verloren, wie erwähnt, diese Eigenschaft schnell, und unterschieden sich dann in nichts mehr vom Typus 2 Bact. casei gehören also dahin.

I. 152.

Kurze Kokkobakterien-Formen. Häufig zu zweien, einzelne Zellen zugespitzt. Keine Sporen, unbeweglich, Gram +, sehr dem Bact. lactis acidi ähnlich.

Burriröhre: Rotbraune, kugel- oder linsenförmige Kolonien, 2—3 mm im Durchmesser, mit glatter Oberfläche.

Agarstrich: Schlechtes Wachstum. Flacher, glatter, glänzender Faden.

Agarstich: Wenig charakteristischer, kräftiger, rötlichbrauner Faden.

Gelatinestich: Sehr charakteristisch. In Peptonmolkengelatine kräftiger als in Fleischpeptongelatine. Kein Oberflächenwachstum oder äußerst geringes. Im Stichkanal ein sehr kräftiger, lebhaft rostbrauner, gefältelter oder knotiger Faden. Keine Verflüssigung.

Peptonmolken: Flockiger, rötlicher Bodensatz.

Kartoffel: Schlechtes oder gar kein Wachstum, zieht sich hinab in den Wattebausch, der rötlichbraun gefärbt wird.

Milch: Koaguliert bei saurer Reaktion bei 20° nach einem Monat, bei 30° nach 8 Tagen. Gerinnsel fest, homogen; am Boden geringer, rostfarbener Bodensatz. In sehr alter Milch Gasbildung.

Biochemisches Verhalten: Aus den drei Zuckerarten: Säure ohne Gas. Glyzerin wird nicht gespalten. Aus Calc. lactat (in Flaschen mit Patentverschluß) kräftige Entwicklung, etwas Gasbildung bemerkbar, die Kultur riecht unangenehm.

Nitratreduktion, Amylase, Lipase, Indol, H_2S, NH_3 fehlt.

Farbstoffbildung: Bei 30° im Agarstich rötlich, Agarstrich gelblich. Am schönsten — rötlich-rotbraun — im Gelatinestich.

Temperaturansprüche: Gutes Wachstum bei 20° und 30°, keines bei 38°. Fakultativ anaërob.

Speziesbestimmung: Gleicht dem Bact. rudensis (Connelli) der Beschreibung von Conn nach. Wir können wie Conn von unserem Mikroben sagen, daß, falls er farblos wäre, er sich nicht von Bact. lactis acidi unterscheiden ließe. Nach Connell soll Bact. rudensis beweglich sein, was jedoch Conn bei 3 Stämmen nicht fand. Nach Harding, Rogers und Smith¹) bildet Bact. rudensis nur auf Kartoffel Farbstoff, auf Laktoseagar und Gelatine nicht und wächst auf letzterer kaum. Unserem Bacterium und so auch dem Bact. rudensis ähnlich ist Bact. acidi propionici var. ruber (Thöni et Alleman)²), das morphologisch gleichfalls an Bact. lactis acidi erinnert, wie ja eine Verwandtschaft zwischen den Milchsäure- und Propionsäurebakterien zweifelsohne besteht. Die schwarzen Punkte im Emmentalerkäse werden durch eine Varietät von Bact. lactis hervorgerufen, die braunen von Bact. acidi propionici var. fuscum. Löhnis³) erwähnt, daß es rotbraune Varietäten von Streptococcus lactis gibt. Unsere Bakterie gleicht sehr dem Bact. acidi propionici var. ruber. Als Unterschied wäre zu vermerken, daß dieselbe im Gelatinestich nur sehr langsam als feiner, rötlichgelber Faden wächst, unsere aber dick und kräftig rotbraun. Auf Kartoffel konnten wir kein Wachstum beobachten. Bact. acidi propionici var. ruber wächst aber sehr gut auf Kartoffel. Ob Propionsäure und Essigsäure in Milch gebildet werden, wie von Allemann und Thönis Bakterien, untersuchten wir nicht; die geronnene Milch schmeckt aber nicht wie eine durch Milchsäure zum Gerinnen gebrachte, sondern eigentümlich aromatisch, schwach sauer und kratzt etwas. Wir halten die Bakterie, wenn nicht für identisch, so doch für sehr nahestehend dem Bact. acidi propionici var. ruber (Thöni et Allemann).

II. 153, III. 153.

Kurzes, kleines Bacterium (Coccobacterium) erinnert an Streptococcus lactis (Bact. lactis acidi); zumeist Doppelformen, selten Einzellformen mit etwas gespitzten Enden, selten in Ketten von 4—6 Gliedern. Nicht beweglich, nicht sporenbildend, Gram positiv.

---

¹) New York Exp. Stat. Bull. No. 183.

²) Landw. Jahrb. d. Schweiz. Bd. 22. 1908. p. 45; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 25. 1910. p. 22.

³) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 18. 1907. p. 97.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Agarplatte: Schnell wachsende, runde, flach erhabene oder brustwarzenförmige, glattrandige Kolonien von hyaliner Struktur.

Agarstrich: Mäßiges, oft schleierartiges Wachstum. Auf der Oberfläche zerstreute, wie oben beschriebene Kolonien, teilweise zusammenfließend, teilweise isoliert, grau-weißlich, im durchscheinenden Lichte opaleszierend.

Gelatinestich: Mäßiges Oberflächenwachstum, schwacher Faden im Stichkanal. Verflüssigt nicht.

Peptonmolken: Geringer, fadenziehender Bodensatz und Ringbildung.

Bouillon: Wächst sehr schlecht.

Kartoffel: Sehr mäßiger, schleierartiger Belag, oft bleibt Wachstum aus.

Milch: Bei 20° und 30°, selbst nach einem Monat, unverändert, auch nach der Kochprobe. Reaktion unverändert.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose: Säure ohne Gas; aus Saccharose: Spur von Säure; aus Milchzucker, Glyzerin: keine Säure. Amylase, Lipase, Nitratreduktion, Ammonia, H_2S nicht vorhanden.

Speziesbestimmung: Gleicht morphologisch sehr dem Streptoc. lactis (Lister) Löhnis (Bact. lactis acidi), vergärt jedoch Milchzucker nicht; nicht beweglich; eher aërob als fakultativ anaërob. Mag mit Bact. lactis innocuus (Wilde) Löhnis identisch sein, obwohl bei einem jeden der Stämme die Milch-Peptonisation fehlt.

III. 154.

Dünne, schlanke, über 1 μ lange, lebhaft bewegliche, nichtsporenbildende, nach Gram nicht färbbare Stäbchen, meist einzeln, oft zu zweien.

Agarplatte: Runde, glatte, brustwarzenförmig erhabene, glattrandige, durchscheinende Kolonien.

Agarstrich: Gutes Wachstum in Form eines flachen, glänzenden, glatten Bandes. Der Agar fluoresziert grün.

Gelatinestich: Kräftiges Oberflächenwachstum in Form einer faltigen Haut, im Stich keine Entwicklung. Trichterförmige, später zylindrische Verflüssigung.

Peptonmolken und Bouillon: Diffuse Trübung; fadenziehender Bodensatz, geringe Ringbildung.

Kartoffel: Nicht charakteristisch. Dünner, über die Kartoffel ausgebreiteter Belag.

Milch: Wird, ohne vorher zu gerinnen, langsam vollständig aufgelöst.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose und Saccharose Säure ohne Gasbildung, Laktose, Glyzerin wird nicht angegriffen; Amylase, Indol, H_2S, Nitratreduktion, NH_3 nicht vorhanden. Fettspaltung sehr stark.

Farbstoff: Die Kulturen fluoreszieren grünlich, besser bei 20° als bei 30°. Farbstofff in Chloroform nicht löslich, also nicht Pyocyanin.

Speziesbestimmung: Offenbar: Bact. fluorescens (Flügge) L. et N.

III. 155.

Kürzere und längere, schlanke, sporenlose, Gram negative Stäbchen.

Gelatineplatte: Schnell wachsende, amöbenartige, gelappte oder auch ganzrandige, glänzende, graue Kolonien mit körniger, graupunktierter Oberfläche. Der Nährboden in der Umgebung grün fluoreszierend.

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, glänzender, glatter, durchscheinender, bläulicher Belag, reichliche Entwicklung im Kondenswasser.

Gelatinestich: Reichliches, ausgebreitetes Oberflächenwachstum, im Stich keine oder sehr spärliche Entwicklung; keine Verflüssigung.

Peptonmolken: Geringe diffuse Trübung, Haut und reichlicher, schleimiger Bodensatz.

Kartoffel: Glänzender, glatter, bräunlicher Belag.

Milch: Unverändert.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose Säure ohne Gas; Laktose, Saccharose und Glyzerin wird nicht vergärt, Nitrate nicht reduziert; Amylase, Indol, H_2S, Ammonia nicht vorhanden. Lipase reichlich.

Farbstoffbildung: Die Nährböden grün fluoreszierend.

Speziesbestimmung: Bewegliche, Gelatine nicht verflüssigende Stäbchen, Nährboden grün fluoreszierend. Offenbar Bact. putidum (Flügge) L. et N.

I. 156, II. 156, Va. 156, Vb. 156.

Sehr feine, dünne, kleine bis mittellange Stäbchen, oft zu 2, unbeweglich, keine Sporenbildung, Gram negativ.

Agarplatte: Runde, glänzende, glatte, konvexe, oft nabelartig erhabene, gelbe, fein grau punktierte, durchscheinende Kolonien.

Agarstrich: Wächst oft sehr schlecht, flacher, glatter, glänzender Faden oder schmales Band. Der Agar wird oft getrübt.

Gelatinestich: Auf Fleischextraktgelatine gutes Gedeihen auf der Oberfläche, selbst nach 6 Wochen nur kleine Verflüssigungsschale. Im Stich feiner Faden oder Perlschnur. Manchmal tritt Verflüssigung ein. Auf Molkengelatine sehr schlechtes Wachstum.

Peptonmolken und Bouillon: Loser, gelblicher Bodensatz, in Bouillon auch diffuse Trübung.

Kartoffel: Wächst reichlich, flach erhaben, glänzend, fein, nur mit der Lupe sichtbar gefältelt, zitronengelb; Konsistenz schleimig oder butterartig.

Milch: Gerinnt meist nach 8—10 Tagen gleichmäßig. Oft ist die Milch nach 14 Tagen noch flüssig, dann tritt bei der Kochprobe Gerinnung ein.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Laktose, Säure ohne Gas, aus Saccharose nur in Spuren; aus Glyzerin wird keine Säure gebildet, oft fehlt sogar jede Entwicklung. Amylase, Lipase, Indol, Ammonia, Nitratreduktion nicht vorhanden; H_2S: Spur.

Farbstoff: Lebhaft grüngelb, in dünner Schicht bei 20° fast grün. Auf Kartoffel eher zitronengelb, bei höheren Temperaturen crêmefarbig oder grau.

Zwei Stämme fanden sich in großer Zahl auf den Platten aus dem 5 Minuten bei 85° erhitzten Material, ertrugen also die Pasteurisation.

Speziesbestimmung: Feine, dünne, unbewegliche, langsam oder gar nicht verflüssigende Stäbchen, in Milch Säuregerinnung, grünlichgelb. Bis auf die fehlende Beweglichkeit stimmt die Beschreibung mit der des Bact. turcosum (Zimm.) L. et N. überein. Bei Bact. turcosum soll auch die Milchgerinnung fehlen. Wir sahen jedoch, daß dieselbe auch bei uns oft ausblieb und nur auf die Kochprobe erfolgte. Vielleicht also Bact. turcosum var. immobilis.

II. 156 a.

Unterscheidet sich von den vorherigen durch die schmutziggelbe Farbe, die immer fehlende Verflüssigung und dadurch, daß Milchzucker nicht vergärt wird, also auch keine Milchgerinnung stattfindet.

II. 156 b.

Unterscheidet sich vom vorherigen nur in einigen Punkten: Sehr kleines Kurzstäbchen. Kolonien gefältelt, mit zerrissenem Rand und irregulärer Form. Agarstich matt, schwach gefältelt, zitronengelb, hautartig; Kartoffel breites, flaches, matt, leicht zerbröckelndes Band, keine Verflüssigung der Gelatine, nur spärliches Wachstum. Bouillon loses Häutchen.

Biochemisches Verhalten bis auf die fehlende Milchzuckervergärung wie bei Bact. turcosum.

I. 157.

Sehr kurzes Stäbchen (Kokkobakterie) mit abgerundeten Enden, häufig zu zweien, bildet keine Sporen, nicht beweglich, Gram positiv.

Gelatineplatte: Langsam wachsende, flache, rundliche (4—6 mm), zitronengelbe Kolonien, die langsam in eine große Verflüssigungsschale einsinken. Oberfläche glatt, ohne Struktur, opak, Rand immer gekerbt.

Agarstrich: Wächst gut in Form eines konvexen, glänzenden Bandes mit glatter Oberfläche. —

Gelatinestich: Kräftiges Oberflächenwachstum, im Stichkanal schwacher Faden. Verflüssigung zuerst scheidentrichterförmig, später zylindrisch, sehr langsam. —

Peptonmolken und Bouillon: Diffuse Trübung, fadenziehender Bodensatz. —

Kartoffel: Bei 20° glänzender, gelber Faden, bei 30° kaum sichtbar, farblos. —

Milch: Schwach sauer, nach 14 Tagen vollständig aufgelöst, ohne vorher zu gerinnen. — Gelber Bodensatz. —

Biochemisches Verhalten: Aus den 3 Zuckerarten Säure ohne Gas, aus Glyzerin nicht; Indol, Lipase nicht vorhanden; Amylase Spur; Nitrate werden reduziert, H_2S: Spur. Farbstoffbildung: Bei Zimmertemperatur schwefelgelb, bei 30° farblos, später mehr graugelb, crêmefarbig.

Speziesbestimmung: Kurzes Stäbchen, unbeweglich, schwefelgelb bis graugelb, Gelatine verflüssigend. Wohl identisch mit Bact. helvolum (Zimm.) L. et N., dessen Beschreibung bis auf die Peptonisation der Milch und die bei uns fehlende Häutchenbildung sehr gut auf unser Stäbchen paßt. Von Bact. turcosum, das wir in den Händen gehabt zu haben glauben (Siehe p. 499), unterscheidet sich dieses Stäbchen durch Form, Gestalt, Gram-Färbbarkeit sowie dadurch, daß es Nitrate reduziert, eine Kasease bildet und in Spuren auch Amylase vorhanden ist.

II. 158, III. 158.

Sehr kurze, dicke Stäbchen (Kokkobakterie) von 1—1,8 μ Länge und 0,6—0,8 μ Breite, oft zu 2, nicht sporenbildend, nicht beweglich, Gram-positiv. —

Agarplatte: Runde, glatte, terrassenartig erhabene, ganzrandige Kolonien.

Agarstrich: Reichliches Wachstum, glänzend, glatt; flach-konvexes Band oder Strich von butterähnlicher Konsistenz. —

Gelatinestich: Mäßiges Oberflächenwachstum, im Stichkanal dünner, amorpher Faden. Keine Verflüssigung.

Peptonmolken: Schwach diffus getrübt, geringer Bodensatz.

Bouillon: Geringer Bodensatz.

Milch: Bleibt unverändert.

Kartoffel: Schlechtes Wachstum.

Biochemisches Verhalten: Aus keinem der drei Zucker und Glyzerin Säure oder Gas; Amylase, Indol, Ammonia, H_2S, nicht vorhanden. Fett wird gespalten. Einer reduziert Nitrate; Farbstoff: Bei 30° cadmium-orange, später hell crêmefarben, bei 20° zeigt sich auf weißem Grund eine orangefarbene Zeichnung, die später orangefarbig wird. Stamm II. 158. Ist anfangs grau, später ziegelrot-orange. Gedeihen bei 20° besser als bei 30°.

Speziesbestimmung: Bis auf die Nitratreduktion stimmen die zwei Stämme überein. Die nicht beweglichen, sehr kurzen und kräftigen Stäbchen, die Gelatine nicht verflüssigen, sind vielleicht mit Bact. cremoides L. et N. identisch, das bloß kurz beschrieben, interimistisch in die Diagnostik aufgenommen ist.

I. 159.

Sehr kleine, kaum über ein μ lange, bewegliche, nicht sporenbildende, Gram-negative Stäbchen. Keine Kettenbildung.

Agarplatte: Runde, glatte, konvexe, glattrandige Kolonien ohne Struktur. —

Agarstrich: Mäßiges Wachstum in Form eines flachen, glänzenden, glatten, gelblichen, zähschleimigen Bandes. Fäkalgeruch. —

Gelatinestich: In Molkenpeptongelatine kaum sichtbares Wachstum im Stichkanal. In Fleischpeptongelatine schwaches Oberflächenwachstum, im Stichkanal schwacher, knotiger Faden und kleiner Verflüssigungstrichter. —

Peptonmolken: Diffuse Trübung, glatte, schleimige, dicke Haut, fadenziehender Bodensatz. —

Bouillon: Bodensatz. —

Kartoffel: Mäßiges Wachstum, glatter, glänzender, schmutziggelber, flacher Belag. —

Milch: Alkalisch, auf der Oberfläche kräftige, gelbe Haut, darunter nach 4—5 Tagen langsame Verflüssigung, ohne daß Gerinnen einsetzte. — Starker Fäkalgeruch. —

Biochemisches Verhalten: Keine Säure noch Gas aus Dextrose, Laktose, Saccharose, Glyzerin; Amylase, Lipase, Nitratreduktion, Ammonia nicht vorhanden; Indol und H_2S reichlich. Farbstoff: schmutzig-gelb, ockergelb. —

Speziesbestimmung: Bewegliches, schmutzig-gelbes, verflüssigendes, Indol- und Fäkalgerucherregendes, kleines Stäbchen. Gleicht dem Bact. ochraceum (Zimm.) L. et N., obwohl in dessen Beschreibung von dem Gestank und der Peptonisation nicht gesprochen wird und unser Stäbchen Gram-negativ ist. —

III. 160.

Kurze, schlanke, 1—2 μ × 0,8—1 μ große, lebhaft bewegliche, scharf abgeschnittene, sporenlose Gram-negative Stäbchen. Einzeln, nicht in Ketten noch Fäden. —

Agarplatte: Runde, 5—8 mm große, glattrandige, flach-konvexe Kolonien; von der Mitte aus radiäre, reiche Fältelung. —

Agarstrich: Reichlich, bandförmig, glänzend; Oberfläche mit kleinen Warzen besät, schleimig, fadenziehend, angenehm aromatisch riechend. In Kondenswasser auffallend reichliches Wachstum. Hell-ockergelb. —

Gelatinestich: Kräftiges Oberflächenwachstum, recht kräftig auch im Stichkanal, anfangs schalenartige, später zylindrische Verflüssigung. Hautbildung. —

Peptonmolken: Schwache diffuse Trübung, schleimiger Bodensatz und Ring. Bouillon Bodensatz. — Die flüssigen Kulturen werden alle schleimig fadenziehend.

Kartoffel: Breitet sich über die Oberfläche in Form eines flachen, glatten, nach Fruchtester riechenden Belages. —

Milch: Wird bei saurer Reaktion, ohne vorher zu gerinnen, langsam vollständig peptonisiert; gelber Ring und Bodensatz; die aufgelöste Milch gelb, darin Flocken, Riecht nach gutem Käse. —

Biochemisches Verhalten: Aus den drei Zuckerarten und Glyzerin Säure ohne Gas; Amylase, Indol, Nitratreduktion, Ammonia, H_2S nicht vorhanden. Fettspaltung sehr kräftig.

Speziesbestimmung: Bewegliches, hell-ockergelbes Bacterium, entwickelt sich auffallend stark im Kondenswasser, schleimig-fadenziehend, verflüssigend, riecht aromatisch, vergärt die 3 Zucker und Glyzerin, sehr kräftiger Fettspalter. —

Mit keinem den bei Lehm. et N. beschriebenen gelben Bakterien zu identifizieren, offenbar neu: Bact. saponificans n. sp.

III. 161.

Feines, schlankes, kurzes Stäbchen (0,3—0,5 × 1,5—2 μ), sehr lebhaft beweglich, nicht sporenbildend, Gram-negativ.

Agarplatte: Irregulär, flach, gefältelt, mit gewelltem Rand. —

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, bandförmig, flach durchscheinend, glatt. —

Gelatinestich: Wächst besser auf der Oberfläche; im Stichkanal dünner Faden. Nicht verflüssigend, nicht schleimig. —

Peptonmolken: Diffus getrübt, schleimige Fetzen als Bodensatz. —

Kartoffel: Gleicht dem Agarstrich.

Milch: Bei alkalischer Reaktion langsame diffuse Peptonisation ohne Gerinnung. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose und Saccharose Säure ohne Gas, aus Laktose, Glyzerin weder Säure noch Gas; Amylase, Indol, H_2S, Nitratreduktion, Ammonia nicht vorhanden. Fettspaltung: Kräftig.

Farbstoffbildung gelb, in durchscheinendem Licht grünlich-gelb.

Speziesbestimmung: Feines Stäbchen, nicht verflüssigend, Milch peptonisierend, Milchzucker und Glyzerin nicht vergärend, kräftig fettspaltend. Unterscheidet sich vom vorhergehenden durch Fehlen der Gelatineverflüssigung, Milchzucker-, Glyzerinvergärung und in noch einigen kleineren Eigenschaften. Gemeinsam ist die starke Fettspaltung: Bact. adipis n. sp.

I. 167.

Lange, schlanke und kräftigere, nicht sporenbildende, unbewegliche, nach Gram färbbare Stäbchen, oft zu zweien und fadenbildend.

Agarplatte: Maulbeerartig, mit gewelltem Rand und blasiger Oberfläche. —

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, flach erhabenes, glattes, glänzendes Band; orangefarben.

Gelatinestich: Gute Entwicklung auf der Oberfläche, im Stichkanal schlecht, Verflüssigung trichterförmig. —

Peptonbouillon: Diffuse Trübung, wenig Bodensatz. —

Peptonmolken: Keine Entwicklung.

Kartoffel: Versagt wiederholt.

Milch: Gerinnt durch Lab, nach 10 Tagen langsames Peptonisieren. —

Biochemisches Verhalten: Vergärt keine der drei Zuckerarten, wächst in der Glyzerinnährlösung nicht; Amylase, Lipase, Indol, Nitratreduktion, H_2S nicht nachweisbar. — Wächst bei 20° besser als bei 30°. —

Speziesbestimmung: Bewegliches, fadenbildendes, orangefarbenes, gelatineverflüssigendes, Milch peptonisierendes Bacterium. Vom Bact. fulvum (Zimm.) L. et N. nicht zu trennen, offenbar identisch mit demselben. —

II. 163.

Kurzes Bacterium, häufig in zoogloeaartigen Gruppen, keine Fäden, Kapsel vorhanden, beweglich, Gram-negativ. —

Agarplatte: Wächst schnell; flache, 5—6 mm große, glatte, glänzende, etwas schleimige Kolonien mit hellem Hof und schleimiger Mitte.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Agarstrich: Reichliches Wachstum in Form eines breiten Bandes, glatt, glänzend, rötlich-gelb, schleimig, im Kondenswasser gelatinös. —

Gelatinestich: Mäßiges Oberflächenwachstum; wächst im Stichkanal gut, tannenartig verzweigt; schalenförmige, schwache Verflüssigung. —

Kartoffel: Mäßige Entwicklung, ockergelb, sonst wie Agarstrich.

Bouillon: Diffuse Trübung, geringer, gelber Bodensatz.

Milch: Gerinnt spontan selbst nach 14 Tagen nicht, jedoch bei der Kochprobe. Schwach sauer. —

Biochemisches Verhalten: Aus den drei Zuckerarten und Glyzerin Säure ohne Gas; Indol, Nitratreduktion, Ammonia, H_2S nicht vorhanden, desgleichen Lipase und Amylase.

Speziesbestimmung: Rötlich-gelb, beweglich, verflüssigend. Vielleicht mit Bact. chrysogloea Zopf. verwandt, obwohl, nach L. et N., in der Gruppe, wohin Bact. chrysogloea gehört, im Stich Ästchen niemals vorkommen.

II. 164 a, II. 164 b.

Sehr kurze Stäbchen (Coccobacterium), nicht beweglich, ohne Kapsel, nach Gram nicht färbbar.

Agarplatte: Langsam wachsende, runde, konvexe, glatte Kolonien von amorpher Struktur. —

Agarstrich: Langsam wachsend, flach, bandförmig, glatt oder etwas gekörnt, glänzend.

Gelatinestich: Sehr schlechtes Wachstum sowohl im Stich als auch auf der Oberfläche.

Kartoffel: Mäßiges Wachstum, schmales Band wie bei Agarstrich.

Bouillon: Schwach getrübt, reichlicher Bodensatz.

Milch: Unverändert.

Biochemisches Verhalten: Von den drei Zuckerarten und Glyzerin vergärt ein Stamm bloß Dextrose, der andere keinen der Zucker; Amylase, Indol, Nitratreduktion, Ammonia, H_2S nicht vorhanden. Lipase bei Stamm II. 164 a, beim anderen nicht nachweisbar. — Farbstoffbildung: Orange- bis rostrot, später karmin. —

Speziesbestimmung: Rotgelb, rostrot, fehlende Verflüssigung, unbeweglich, also wahrscheinlich Bact. latericium (Adametz) L. et N.

III. 165.

Lange, schlanke, (0,8—1,0 × 4—15) Stäbchen mit scharf abgeschnittenen Enden, oft paarweise und in flüssigen Kulturen fadenbildend, beweglich, Gram-negativ, keine Sporen.

Gelatineplatte: Runde, glattrandige, tellerförmig einsinkende, farblose Kolonien; Inhalt punktiert. —

Agarstrich: Glänzender, flacher, dünner, sich ausbreitender, grauer Belag. Im Kondenswasser sehr kräftiges, schleimiges Wachstum von blaßrosa Farbe. Spätere Kulturen glänzend, flach, reliefartig gezeichnet, blaßrosa, durchscheinend, der Rand seidenglänzend.

Gelatinestich: Kräftiges Oberflächenwachstum, feiner Faden im Stichkanal, trichterförmige, bald zylindrische Verflüssigung, reichlicher, roter Bodensatz, der verflüssigte Teil klar, farblos. Spätere Kulturen verflüssigen nur noch trichterförmig.

Peptonmolken und Bouillon: Farbloser, fadenziehender Bodensatz.

Kartoffel: Reichliches Wachstum, sich ausbreitender, kräftiger, schleimiger, rötlich-gelber Belag; Geruch angenehm aromatisch.

Milch: Gerinnt bei saurer Reaktion von der Oberfläche abwärts; das gelbe Gerinnsel löst sich langsam auf, riecht angenehm aromatisch. —

Biochemisches Verhalten: Dextrose, Laktose, Saccharose, Säure ohne Gasbildung; Glyzerin Säure (Spur); Amylase reichlich; Nitratreduktion, Lipase, H_2S und Indol fehlt; Ammonia Spuren.

Farbe. Rosafarben, ohne Goldglanz. Die Saccharose-Kultur opalisiert stark. —

Speziesbestimmung: Wird kaum mit Bact. prodigiosum verwandt sein, unterscheidet sich nämlich von diesem sowohl, was die Größe der Zellen anbelangt, wie auch durch Fehlen des Goldglanzes und der Farbe, auch fehlt der Geruch nach Trimethylamin. Unter den von Hefferan[1]) beschriebenen roten Bakterien findet sich kein gleiches. Bact. rufum n. sp.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. 1904. p. 529.

Tabelle II.

Biochemische Eigenschaften der Bakterien-Stämme.

Bezeicdnung	Name	Dextrose	Laktose	Milchgerinn.	Saccharose	Amylum	Fett	Glyzerin	Gelatine	Kasein	Nitrat	Ammonia	Indol	H_2S	Farbe
		Spaltung										Produktion			
I. II. III. IV. Va. Vb. 151.a —	Bact. casei Leichmann	∓	+	+	∓	—	—	∓	—		—	—	—	—	grau weiß
I. 152	B. l. propionici var. ruber	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	rost-rot
II. III. 153	B. lact. innocuum	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	weiß
III. 154	Bact. fluorescens	+	—		+	—	+	—	+	+	—	—	—	—	grau-grün
III. 155	Bact. putidum	+	—		—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	graugrün
I. II. Va. Vb. 156	Bact. turcosum	+	+	∓	±	—	—	—	±	—	—	—	—	±	hellgelb
I. 157	Bact. helvolum	+	+	—	+	±	—	—	+	+	+	—	—	±	grau-gelb
II. III. 158	Bact. cremoides	—	—		—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	orange später crême
I. 159	Bact. ochraceum	—	—		—	—	—	—	±	+	—	—	+	+	gelb-braun
III. 160	Bact. saponificans	+	+	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	hell ockergelb
III. 161	Bact. adipis	+	—		+	—	+	—	—	+	—	—	—	—	schmutzig gelb
I. 162	Bact. fulvum	—	—		—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	orange
II. 163	Bact. chrysogloea	+	+	—	+	—	—	+	±	—	—	—	—	—	rötlich-gelb
II. 164	Bact. lateritium	∓	—		—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	orange rost-rot karmin
III. 165	Bact. rufum	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	±	—	—	rosa

NB.: + = immer vorhanden; ± = in Spuren; ∓ = bei einigen Stämmen vorhanden, bei anderen nicht; — = niemals vorhanden.

Aërobe Bazillen.

III. 201.

Schlanke, feine Stäbchen, bis 2 μ lang, 0,5—0,8 μ breit, häufig in Ketten oder Scheinfäden, beweglich, Gram-positiv. Sporen eiförmig, fast endständig, Bakterienzelle aufgetrieben. —

Agarplatte: Runde, flach erhabene, glänzende, glattrandige Kolonien mit Hof.

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, flacher, glattrandiger, grauer Belag, anfänglich opaque, milchhautartige Konsistenz; spätere Kulturen seidenglänzend, im durchscheinenden Licht opalisierend und von butterartiger Konsistenz. —

Gelatinestich: Auflage; wächst im Stichkanal kaum. Verflüssigung scheidentrichterförmig, später zylindrisch, sehr langsam.

Peptonmolken: Schwache, flockige Trübung, lockerer, flockiger Bodensatz, dünnes, schleierartiges, zerrissenes Häutchen.

Kartoffel: Mäßige Entwicklung; glatter, schleierartiger, über die Oberfläche sich ausbreitender Belag.

Milch: Gerinnt nach 10 Tagen bei alkalischer Reaktion und wird langsam peptonisiert. Nach 4 Wochen erst die Hälfte gelöst. —

Biochemisches Verhalten: Dextrose, Laktose, Saccharose, Glyzerin werden nicht angegriffen; Nitratreduktion, Ammonia, H_2S, Indol, Lipase nicht vorhanden.

Speziesbestimmung: Gleicht sehr einer von Král's Museum als Bac. fusiformis M, et G. erhaltenen Form, sowohl morphologisch als auch biologisch. —

I, 202, III. 202.

Schlanke Stäbchen, mit abgerundeten Enden, 2—3 μ × 0,8—1 μ groß, mit mittelständigen, nicht aufgetriebenen Sporangien; Sporen fast viereckig, kettenbildend, lebhaft beweglich, Gram-positiv.

Agarplatte: Amoebenartige, glänzende, flache, glatte Kolonien mit fingerartigen Ausläufern am Rande.

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, glänzender, flacher, glatter, gelblich-grau- oder crêmefarbener, durchscheinender, schleimiger Belag, am Rande fingerförmige Ausläufer, die im durchscheinenden Lichte gelblich-grün opalisieren. —

Gelatinestich: Auf der Oberfläche kräftige, sich ausbreitende Haut, im Stich schwacher Faden. Verflüssigung in Form einer großen Schale, später zylindrisch, manchmal in der Tiefe sackförmig. —

Peptonmolken und Bouillon: Diffuse Trübung, faltige Haut oder nur Ringbildung; geringer, fetziger Bodensatz. —

Kartoffel: Mäßiger, sich ausbreitender, gelblicher oder crèmefarbener Belag. Im unteren, feuchten Teil der Kartoffel glatt, im oberen trockenen, kleine Falten. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Saccharose, Glyzerin Säure, jedoch kein Gas, aus Laktose nicht. Amylase, Indol, Nitratreduktion nicht vorhanden; Lipase H_2S vorhanden; Ammonia Spur. —

Speziesbestimmung: Stimmt sowohl morphologisch als auch in den biochemischen Eigenschaften sehr gut mit einer von Král erhaltenen Bac. pumilus-M. et G.-Kultur überein. —

I. 203.

Kräftige Stäbchen mit abgerundeten Enden (1,8 × 3—4 μ) oft in Ketten und Fäden, sporenbildend, Gram +. Die Sporen kugelrund, oft in Ketten, perlschnurartig aneinander gereiht.

Agarplatte: Runde, flache, konvexe, glatte, glänzende Kolonien mit ganzem Rand.

Agarstrich: Üppiger, dicker, reliefartig gezeichneter oder glatter, schleimig-fadenziehender Belag. Derselbe fließt nach dem Kondenswasser herab. Farbe schmutzig-gelb, besonders im Kondenswasser gut sichtbar.

Gelatinestich: Üppiger Belag, im Stichkanal kein Wachstum, vom Beginn an zylindrische Verflüssigung; die verflüssigte Gelatine trüb.

Peptonmolken: Reichlicher, schleimiger Bodensatz und Ringbildung.

Milch: Bei schwach alkalischer Reaktion schnell peptonisiert.

Biochemisches Verhalten: Dextrose, Laktose, Saccharose, Glyzerin, Säure ohne Gas; Amylase, H_2S, Ammonia vorhanden; Nitratreduktion, Indol, Lipase fehlen.

Speziesbestimmung: Stimmt recht gut überein mit einer von Král erhaltenen Kultur des Bac. luteus sporogenes.

III. 204, IV. 204.

Schlanke Stäbchen mit abgerundeten Enden, 0,8—1 μ breit, zu 3 μ bis zu 40—50 μ langen Scheinfäden auswachsend, lebhaft beweglich, nach Gram färbbar; endständige Sporen 2 μ breit, bis 4 μ lang.

Agarstrich: Sehr kräftiger, flacher, glänzender, reliefartig gezeichneter, manchmal gefältelter, zähhäutiger, grauer, über die Oberfläche sich ausbreitender Belag.

Gelatinestich: Kräftige Haut auf der Oberfläche, die sich infolge Gasbildung oft blasenartig erhebt. Zuerst scheidentrichterförmig, später zylindrische Verflüssigung. Im Stichkanal sehr schwache Perlschnur oder Faden.

Peptonmolken: Flockige Trübung, zäher, fadenziehender Bodensatz, auf der Oberfläche Haut- oder bloß Ringbildung.

In Bouillon bloß Bodensatz.

Kartoffel: Kräftiger, sich ausbreitender, glänzender, gerunzelter oder ungleich erhabener, oft mit Gasblasen bedeckter schleimiger Belag.

Milch: Gerinnt nach 24—36 Stunden infolge Säurebildung. Das Koagulum ist infolge Gasbildung zerrissen; am 5. Tage beginnende Peptonisierung, Serum gelb, enthält Flocken, sonst klar.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Laktose, Saccharose, Maltose und Glyzerin, Säure- und kräftige Gasbildung; Amylase vorhanden (+) Lipase, Nitratreduktion, Ammoniak, Indol, H_2S fehlt.

Speziesbestimmung: Offenbar Bac. asterosporus (A. Meyer) Migula.

I. 205.

Kräftige, 1 μ dicke, 3—4 μ lange Zellen, auch in Ketten und Fäden, beweglich, Gram-positiv. Sporen eiförmig, endständig, Sporangien etwas aufgetrieben.

Agarstrich: Wächst reichlich in Form eines breiten, glatten, glänzenden oder etwas reliefartig gezeichneten, grauweißen Bandes, das sich terrassenartig über die Oberfläche des Agars erhebt. Opak, Konsistenz butterartig.

Gelatinestich: Kräftiger Belag, wächst im Stich nicht. Von Beginn an zylindrische Verflüssigung, der gelöste Teil wasserhell.

Peptonmolken und Bouillon: Klar, auf der Oberfläche Ringbildung oder lose, nicht geschlossene Haut, flockiger Bodensatz.

Kartoffel: Schmutzig graubraun, reichlich, kleine Falten.

Milch: Ohne vorher zu gerinnen, tritt kräftige Peptonisierung ein.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Saccharose und Glyzerin Säure ohne Gas; Laktose wird nicht angegriffen; Amylase, Indol nicht vorhanden; Nitratreduktion, Ammoniak, Fettspaltung kräftig; H_2S vorhanden.

Nicht zu identifizieren, offenbar neu: Bac. gravidus n. sp.

Differentialdiagnose zwischen Bac. I. 212, I. 209 und I. 205.

Bac. I. 212: Feines, kurzes Stäbchen. Matt, faltenbildend, häutig, gelblich, langsam verflüssigend, Nitrate reduzierend.

Bac. I. 209: Lange, schlanke Stäbchen, längliche Sporen, glänzend, Agarstrich am Rande gelockt, gelblich, reduziert Nitrate nicht.

Bac. 205: Kurzes, kräftiges Stäbchen, glänzend, nicht gelockt im Agarstich, wächst nicht hinein, grau, reduziert Nitrate nicht, spaltet Fett, hingegen die vorherigen nicht.

II. 206.

Mittelgroße Stäbchen mit abgerundeten Enden, einzeln oder zu zweien, auch kettenbildend, Sporangien wie die vegetative Zelle, Sporen mittelständig, walzenförmig. Lebhaft beweglich. Gram ±.

Agarstrich: Reichliches Wachstum, ausgebreiteter, flacher, fein netzartig gefältelter, glänzender, grau-weißer, etwas schleimiger Belag.

Kartoffel: Ausgebreiteter, flacher, glänzender Belag, netzartig, kreuz und quer gefältelt, Konsistenz butterartig.

Gelatinestich: Belag auf der Oberfläche, im Stichkanal keine Entwicklung, zuerst schalen-, später trichterförmige, endlich zylindrische Verflüssigung.

Bouillon: Lose Haut, die leicht reißt, Bodensatz, sonst ganz klar.

Milch: Lockeres Gerinnsel, kräftige Peptonisation bei alkalischer Reaktion.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Saccharose, Glyzerin Säure ohne Gas; Laktose wird nicht vergoren, Stärke nicht verzuckert; Fettspaltung, H_2S und Ammonia vorhanden; Nitratreduktion, Indol fehlen.

Speziesbestimmung: Unterscheidet sich von einem Králschen Bac. teres A. M. et N. durch lebhafte Bewegung, reichlicheres Wachstum auf Agar und das Fehlen von Amylase. Nahestehend oder vielleicht identisch mit Bac. teres.

II. 207.

Mittelgroße Stäbchen mit abgerundeten Enden, bilden oft Ketten und Sporen, die etwas endständig, meist jedoch mittelständig und sehr klein sind, Sporangien oval wie die vegetative Zelle. Lebhaft beweglich. Gram-positiv.

Agarplatte: Wächst gut in Form irregulärer Kolonien, deren Mitte erhaben ist und Warzenbildung aufweist. Gegen den flachen, durchsichtigen Rand laufen radiär seichte Furchen quer über denselben, flache konzentrische Ringe. Die Kolonie dringt mit Ausläufern in den Nährboden hinein.

Agarstrich: Reichliches Wachstum, bandförmig, der Rand gelappt, flach, glänzend oder mattglänzend, zum Teil (oben) feines Faltennetz, zum Teil (unten) glatt, gelblich-grau, durchscheinend, Geruch unangenehm; Konsistenz butterartig.

Kartoffel: Wächst reichlich, der Belag matt, mit reliefartiger Oberfläche, gelb-grau, von butterartiger Konsistenz.

Gelatinestich: Oberflächenbelag, wächst auch im Stichkanal. Zuerst trichterförmige, später zylindrische Verflüssigung.

Bouillon: Oberflächenbelag, reichlicher Bodensatz, sonst unverändert.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Milch: Zuerst locker geronnen; das Gerinnsel später fast ganz aufgelöst, gelbgrau; Reaktion alkalisch.

Biochemisches Verhalten: Aus den drei Zuckerarten und Glyzerin wird Säure, jedoch kein Gas gebildet; Amylase, Lipase, Nitratreduktion, Ammonia vorhanden, kein Indol und H_2S.

Speziesbestimmung: Gleicht, bis auf die bei unserem Bacillus vorhandene Milchzuckervergärung, sehr gut dem Bac. parvus, den wir von Král erhalten haben.

IV. 208.

Dünne, mittelgroße Stäbchen mit abgerundeten Enden, einzeln und in Ketten, mit meist fast endständiger Spore, Sporangium etwas aufgetrieben. Schnelle, schlängelnde Bewegung, grampositiv. —

Agarplatte: Unregelmäßige, schnell wachsende (8—10 mm) flache, glatte Kolonien mit gelapptem, ausgefransten, fast gelocktem Rande.

Agarstrich: Wächst sehr gut, bandförmig, am Rande gelappt flach, glänzend, glatt, nur hie und da punktiert, grau-weiß. Geruch unangenehm; Konsistenz butterartig.

Gelatinestich: Auf der Oberfläche ein sich ausbreitender Belag, nur im oberen Teile des Stichkanals besseres Wachstum. Sehr langsame Verflüssigung, selbst nach 4 Wochen nur schalenförmig. —

Bouillon: Diffus getrübt; fadenziehender Bodensatz.

Kartoffel: Üppige Entwicklung, gelappter, flacher, bandförmiger, glatter, glänzender, gelbbrauner Belag, ähnlich wie bei Bact. coli.

Milch: Weiches Gerinnsel, das sich sehr langsam und nicht vollständig auflöst. Alkalisch, gelbbraun, riecht unangenehm. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Säure ohne Gas, aus Saccharose und Laktose und Glyzerin nicht. Lipase, Amylase, Nitratreduktion, Indol nicht vorhanden, H_2S und Ammonia in Spuren. —

Speziesbestimmung: Ein von Král erhaltener Bac. silvaticus A. M. et N. stimmt sehr gut mit der eben beschriebenen Bakterie überein. Der von Král erhaltene Stamm ist wie der unsrige grau-weiß und nicht, wie er nach der ursprünglichen Beschreibung sein sollte, gelb-braun, und färbt auch den Nährboden nicht. —

I. 209.

Lange, schlanke Stäbchen, oft in Ketten, auch in Fäden, lebhaft beweglich, nach Gram färbbar. Sporen länglich, gestreckt, zumeist endständig, bauchen sich etwas über die Zellwand hinaus.

Agarplatte: Gelappte, amoebenartige Kolonien, in der Mitte warzenartige Erhebungen, gegen den Rand zu flach.

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, flach, glänzend, gelblich-braun, am Rande haarlockenartiger Saum, der jedoch fehlt, wenn die Agaroberfläche nicht feucht genug ist. Wächst in den Agar hinein. Opalescenz; Geruch unangenehm. —

Gelatinestich: Kräftiges Oberflächenwachstum, im Stich nur sehr gering. Trichterförmige, später zylindrische Verflüssigung, nach 6 Wochen bis zur Hälfte. —

Peptonmolken: Geringe, diffuse Trübung, fadenziehender Bodensatz. — Kartoffel: Reichlicher, glänzender, glatter, hell-kaffeebrauner Belag, die K. bräunt sich.

Milch: Schwach alkalisch; ohne vorher zu gerinnen nach 20 Tagen ganz aufgelöst. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose Säure; Laktose, Saccharose werden nicht, Glyzerin in Spuren vergärt. Nitratreduktion, Amylase, Lipase, H_2S, Indol nicht nachweisbar; Ammonia vorhanden. Farbe gelblich-braun (20° C).

Gleicht einigermaßen einem von Král erhaltenen Bac. simplex, der jedoch neben morphologischen Unterschieden Nitrate kräftig reduziert und in Spuren Amylase bildet, Glyzerin nicht spaltet, jedoch Fette; daher vielleicht noch unbekannt: Bac. submergens n. sp.

I. 210.

Stäbchen mit abgerundeten Enden, beweglich, Gram-positiv, sporenbildend, oft in Ketten. Die ovale Spore ist mittelständig, Zelle nicht aufgetrieben. —

Agarplatte: Kraterförmig. Stark erhabene Kolonien mit gelapptem Rand, in der Mitte eine Vertiefung, von der berggratähnlich Falten gegen den Rand laufen. —

Agarstrich: Mäßiges Wachstum, bandförmig oder über die Oberfläche sich ausbreitend, glänzende, mit Wasserblasen oder Falten besetzte Oberfläche (spätere Kulturen mehr glatt), anfänglich grau-braun, ältere Striche schwarz-grau. Der Nährboden wird mit der Zeit schwarz.

Gelatinestich: Kräftige Haut auf der Oberfläche; schalenförmige, später trichterförmige, bald zylindrische Verflüssigung. Im Stichkanal kein Wachstum. Gelatine verfärbt sich nicht.

Peptonmolken und Bouillon: Schwache, diffuse Trübung, Haut- und Bodensatz. —

Kartoffel: Üppig sich ausbreitender, glatter, glänzender, die Kartoffel schwarz färbender Belag.

Milch: Am dritten Tag geronnen; Gerinnsel weich, schwach sauer, löst sich langsam; Serum trübe, weiß.

Biochemisches Verhalten: Aus Laktose und Glyzerin Säurebildung, ebenfalls, jedoch nur in Spuren, aus Saccharose und Dextrose. Amylase, Lipase, Indol H_2S nicht vorhanden; Nitrate werden kräftig reduziert; Ammonia vorhanden.

Farbstoff: Siehe oben.

Vielleicht identisch, jedenfalls nahe verwandt mit dem nur unvollständig beschriebenen Bac. atterimus (Biel) Lehm. et Neum.

I, II, III, IV, V a, V b, 211.

Schlanke Stäbchen mit abgerundeten Enden, mittelgroß, oft in Ketten und Fäden, mit mittelständiger, nicht aufgetriebener Sporangie, sporuliert sehr schnell, sehr lebhaft beweglich, nach Gram färbbar. —

Agarplatte: Schnell wachsende, amoebenartige, flache, in der Mitte gefältelte, gegen den Rand zu glatte Kolonien mit gewelltem oder gelapptem Rand. —

Agarstrich: Üppiger, sich ausbreitender, flacher, matter, hautartiger, mehr oder weniger in Falten gelegter Belag, am Rande mit fingerförmigen Verzweigungen. Die Falten entweder quergerichtet oder wabenartig. Der Agar bräunt sich bei einigen. —

Gelatinestich: Starke, gefältelte Haut, auf der Oberfläche trichterförmige, oft strumpfartige, später zylindrische Verflüssigung. Im Stichkanal höchstens eine Spur von Wachstum. —

Peptonmolken und Bouillon diffus getrübt, später klar, auf der Oberfläche starke, sich an die Wand des Reagensglases anlegende Haut, selten unbedeutender flockiger Bodensatz. —

Kartoffel: Üppiger, sich ausbreitender, matter, häutiger, gelblich-hellbrauner, in Falten gelegter Belag. Die Falten meist draperieartig, selten klein, wabenartig. Oft sind auf derselben Kartoffel unten die ersteren, oben die letzteren zu sehen. Angenehm aromatischer Geruch; die Kartoffel wird bei allen gebräunt. —

Milch: Bei alkalischer Reaktion, ohne vorher zu gerinnen, schnell, nach 4—5 Tagen, vollständig peptonisiert. Während der Peptonisierung tritt die Gerinnung des noch nicht aufgelösten Teiles ein. Farbe gelb-braun. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose und Saccharose Säure ohne Gas, niemals aus Laktose, jedoch in Spuren bei manchen Stämmen aus Glyzerin. Alle Stämme starke Nitratreduzierer und Amylaseerzeuger. Ammonia, H_2S vorhanden; Indol nicht vorhanden. Fettspaltung sehr kräftig. Farbe: In jungen Kulturen alle grau oder crèmefarbig, später werden bis auf 2 alle bräunlich, rehbraun und auch der Agar gebräunt. —

Speziesbestimmung: Die braunen sind offenbar Bac. mesentericus (Flügge) L. et N., die 2 crèmefarbigen Bac. vulgatus (Flügge) L. et N.

II. 211 a.

Unterscheidet sich von Bac. mesentericus in folgenden Punkten:

Agarplatte: Kolonien flach. glatt, nicht gefältelt.

Agarstrich: Bandförmig ausgebreitet, die Mitte schleimig, fadenziehend, der Rand reliefartig gezeichnet oder etwas gefältelt, speckglänzend, zähhäutig, der Agar bräunt sich.

Gelatinestich: Sehr geringes Oberflächenwachstum, lange Zeit nur Verflüssigungsschale, im Stichkanal fadenförmiges, schwaches Wachstum, tannenartige, feine Verzweigungen.

Biochemisches Verhalten: Ganz wie Bac. mesentericus.

Speziesbestimmung: Vielleicht eine schleimbildende, fadenziehende Bac. mesentericus-Varietät. —

I. 212.

Sehr kleine, feine schlanke Stäbchen, oft in Ketten und auch zu Fäden auswachsend. Bewegung träge. Grampositiv. Die Spore ist mittelständig, sehr klein, keimt polar. Die Sporangie behält ganz die Gestalt der vegetativen Zelle.

Agarstrich: Matt glänzend oder matt, quer und der Länge nach mit einem feinen Reliefnetz überzogen, grau-opak, häutig, wächst unter die Oberfläche des Agars hinein. Ältere Kulturen schmutzig-gelb.

Gelatinestich: Oberflächenhaut; im Stichkanal kein Wachstum, sehr langsame, zylindrische Verflüssigung. —

Peptonmolken: Schwache, diffuse Trübung, kräftige Haut auf der Oberfläche, bröckeliger, unbedeutender Bodensatz. —

Kartoffel: Mäßiger, glänzender, gekörnter Belag mit kleinen Fältchen und Wasserblasen; färbt die Kartoffel braun.

Milch: Am dritten Tag flockiges Gerinnsel, das später bei alkalischer Reaktion sehr langsam aufgelöst wird. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose und Saccharose Säure, jedoch kein Gas, ebenfalls aus Laktose, jedoch nur in Spuren. Glyzerinspaltung, Indol, H_2S, Amylase, Lipase nicht vorhanden; Nitrate werden sehr kräftig reduziert und auch Ammonia ist vorhanden.

Speziesbestimmung: Konnte weder mit den bei L. et N. beschriebenen, noch mit den von Král erhaltenen Arten indentifiziert werden, daher offenbar neu: Bac. exilis n. sp.

II. 213.

Kräftiger Bacillus mit abgerundeten Enden, einzeln und in Ketten; die Sporen füllen fast den ganzen Zelleib aus, sind nahezu viereckig. Langsam beweglich. Kapsel vorhanden. Gram-positiv.

Agarstrich: Wächst reichlich, bandförmig, flach, glänzend gefältelt, rosafarben bis lebhaft rot, etwas schleimig, der Rand gelappt.

Gelatinestich: Oberflächenbelag, geringes Wachstum, in dem oberen Teil des Stichkanales zuerst trichterförmige, später zylindrische, sehr langsame Verflüssigung.

Bouillon trüb mit reichlichem Bodensatz.

Kartoffel: Wächst reichlich, flach erhaben, glatt, oft reliefartig erhaben, mattglänzend, blaßziegelrot, schleimig, mit gekerbtem Rand. —

Milch, ohne zu gerinnen, langsam peptonisiert, schwach alkalisch, trübe. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose etwas Säure, ohne Gas; Laktose und Saccharose und Glyzerin werden nicht angegriffen; Amylase, Nitratreduktion, Indol, H_2S nicht vorhanden. Fettspaltung kräftig; Ammonia Spur. Farbstoff rosa bis ziegelrot.

Kaum identisch mit dem zwar nur sehr lückenhaft beschriebenen Bac. mesentericus ruber Globig, der unbeweglich sein soll und da die Farbstoffbildung auf allen Nährböden auffallend lebhaft rot ist, möglicherweise neu: Bac. cerasinus.

I., II., III., V a. V b. 214.

Kräftige Stäbchen mit stumpfen Enden, einzeln, zu zweien, in Ketten und Fäden. Sporangie wie die vegetative Zelle; die länglich ovale Spore sitzt meist dem Ende zu. Langsam schlängelnde Bewegung. Keine Kapsel. Nach Gram färbbar. —

Agarplatte: Schnelles Wachstum. Irregulär, flach, glatt, oft mit strahlenartiger Zeichnung und zerfetztem oder gelocktem Rande. —

Agarstrich: Wächst üppig. Der Rand gelappt und mit haarlockenartigen Ausläufern. Der Belag flach, glänzend, glatt, auf grauer Unterlage weiß gefleckt. Die Kultur riecht unangenehm. Agar verfärbt sich häufig braun. —

Gelatinestich: Oberflächenbelag, im Stich ein nach oben kräftiger werdender Faden, kräftige Verflüssigung; es folgen trichter-, sackförmige und zylindrische Verflüssigung schnell aufeinander. —

Bouillon: Schwache Oberflächenhaut oder Ring, trüb, reichlicher, flockigfetziger Bodensatz.

Kartoffel: Üppiger, sich ausbreitender, flacher, glänzender, glatter Belag.

Milch: Wird bei alkalischer Reaktion energisch peptonisiert. —

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose und Saccharose Säure ohne Gas, aus Laktose nicht; aus Glyzerin bildet der eine der Stämme Säure; Nitratreduktion, Ammonia vorhanden; Amylase, Indol fehlt; H_2S Spur; Lipase vorhanden.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Speziesbestimmung: Gleicht dem Bac. silvaticus, besonders was das biochem. Verhalten betrifft. Als Unterschiede wären zu vermerken, daß diese Art kräftige Stäbchen bildet, aufgetriebene Sporangien, auf Kartoffel grau-weiß wächst, Gelatine und Kasein kräftiger verflüssigt und auf Bouillon schwache Hautbildung zeigt. Nicht sehr unterscheiden sich obige Stämme vom Bac. anthracis, da in jungen Kulturen der Rand oft gelockt und die Struktur einem seidenglänzenden Netz gleicht. Die Apathogenität, Bouillonkultur, Beweglichkeit sprechen wieder dagegen. Es stehen diese Mikroben also vielleicht dem Bac. pseudoanthracis (Burri) und dem Bac. anthracoides (Hüppe et Wood) nahe, von welchem der letztere nach L. et N. mit dem Bac. subtilis verwandtschaftliche Beziehungen hat. — Von letzterem unterscheidet sich unser Bacillus dadurch, daß er langsam beweglich, facult anaërob, im Agarstich gut gedeiht und die Gelatine daher sackförmig verflüssigt, der Agarbelag immer weiß mit gelocktem Rand, niemals Falten bildet, die Kartoffelkulturen immer glänzend und niemals völlig bestäubt sind. Daher offenbar neu: Bac. cirrosus n. sp.

Anaërobe Bazillen.

1. Buttersäurebazillen.

III. 220, V b. 220.

Bazillen mit abgerundeten Enden. Groß (0,8—1,0 μ, 4—8 μ), durchschnittlich 8 μ lang, oft zu 40—50 μ langen Fäden auswachsend, nicht beweglich, Gram-positiv. Die Spore meist mittelständig, selten endständig, 1,8—2,2 μ lang, 0,6 μ breit. Die Sporangie ist häufig, jedoch nicht immer, spindelförmig. Sporuliert sehr leicht und schnell auf zuckerhaltigen Nährböden. —

Agarstrich: (unter Wright-Burri-Verschluß bei 37° C), reichliches Wachstum, schleierartig, glänzend, durchscheinend grau, mit fingerartig verzweigtem oder wolkenförmigem Rand. Im Kondenswasser und zwischen Agar und Glaswand reichliche Entwicklung, Gasblasen unter dem Agarkeil.

Agarstich: Wenig charakteristischer Faden, der Agar zerreißt und wird oft bis zum Wattepfropfen hinaufgetrieben; kräftiger Buttersäuregeruch. —

Gelatinestich: Wächst unter W.-B.-Verschluß weder auf Fleisch, noch auf Molkengelatine. (2 Monate hindurch beobachtet).

Peptonmolken: nach W.-B. verschlossen: Starke, diffuse Trübung, reichlicher, zäher Bodensatz. —

Bouillon: Schwach diffus getrübt, flockenartiger Bodensatz. —

Milch, nach W. B. verschlossen, gerinnt nach 7 Tagen in Form eines zerrissenen von Gasblasen durchsetzten Gerinnsels. Reaktion sauer; angenehmer Geruch nach Buttersäure. Das Gerinnsel löst sich selbst nach Monaten nicht auf.

Biochemisches Verhalten: Aus den drei Zuckerarten und Glyzerin Säure und Gasbildung, kein Indol, jedoch H_2S. Calc. lact. wird nicht angegriffen; Amylase und Nitratreduktion läßt sich nicht feststellen, da sie in den Nährlösungen nicht gedeihen. —

Speziesbestimmung: Bei Bestimmung von Anaëroben kommen die bekannten ausführlichen Arbeiten von Schattenfroh-Grasberger und von Bredemann in erster Linie in Betracht. Nach der letzteren wären unsere Anaëroben auch zur Spezies Bac. amylobacter (Arth. Meyer et Bredemann) zuzuzählen. Mit Grasbergers Buttersäurebakterien stimmt die Beschreibung nicht in allen Punkten. Der Bac. saccharobut. immobilis liquefaciens bildet nur unter ganz besonderenVerhältnissen Sporen (unsere sehr leicht) und verflüssigt auch die Gelatine (unsere wachsen nicht). Bis auf die bei unseren Buttersäurebakterien fehlende Beweglichkeit stimmt Bac. saccharobutyricus mobilis non liquef. gut mit unserer Beschreibung überein. Letzteren nennen L. et N. Bac. saccharobutyricus v. Klecki. Wie es scheint, gibt es hier bewegliche und unbewegliche Formen, und es erscheint uns Löhnis[1]) Auffassung als die richtige, der einen Bac. amylobacter mobilis und immobilis unterscheidet.

XI. 221. (Nov.).

Auffallend dünne, schlanke, strichartige (4—6 μ lange 0,3—0,5 μ breite) Stäbchen, die oft zu langen verworrenen, 100 μ und längeren Ketten und Fäden auswachsen. Träge beweglich bis zur Sporulation. Gram positiv. Die länglichovale Spore sitzt auf dem Ende des Stäbchens obenauf „Köpfchensporen" (1,8×2 μ). Die Sporangie gleicht der des B. tetani[1]), bildet aber niemals mittelständige Sporen. Sporuliert niemals auf zuckerhaltigen Nährböden, sondern nur in Bouillon. —

---

[1]) Landw. bakt. Praktikum. 1911.

Burri-Röhre: Kleine, amorphe, glattrandige, formlose Kolonien zwischen Gasspalten. —

Agarstrich: (Nach Wright-Burri verschlossen): Auf der Oberfläche zerstreut, teilweise zusammengeschmolzen, rundliche, gekerbte oder glattrandige, flachkonvexe, erhabene, bläulich-graue, durchscheinende Kolonien mit fein gekörnter Struktur. Buttersäuregeruch. —

Agarstich: Kurz nach dem Isolieren in der Tiefe tannenartig, wächst später immer schlechter, in Form eines nicht charakteristischen Fadens, der die Oberfläche nicht erreicht, im Agar einige Spalten. Gasbildung nie so kräftig wie bei B. amylobacter.

Gelatinestich: Die Kulturen gehen oft nicht an. In Fleischwassergelatine schleierartiger Faden. In Molkengelatine-Schüttelkultur kleine, nadelstichgroße, kugelige Kolonien zwischen Gasblasen. Keine Verflüssigung, selbst nach ½ Jahr nicht. —

Bouillon unter W.-B.-Verschluß: Nach 24 Stunden feine Gasperlen aufsteigend, diffuse Trübung, später Klärung und es bildet sich ein reichlicher, zäher Bodensatz. Niemals schlechter Geruch oder Gestank.

Kartoffel: Wächst nicht. —

Milch nach 24 Stunden Gasbildung sichtbar, nach 36 geronnen, das Gerinnsel zerrissen, zerfetzt, 2—3 ccm klare Molken, löst sich nicht auf. Buttersäuregeruch, aber viel schwächer wie bei B. amylobacter.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose, Laktose, Saccharose Säure und Gas (Agarschüttelkultur); Glyzerin in der Nährlösung kein Wachstum; in der Glyzerinagarschüttelkultur 2 Gasblasen. (?) Gedeiht in der Nährlösung nicht, daher Amylase; Nitratreduktion nicht bestimmbar; H_2S: vorhanden, Indol nicht. Calc. lactat wird selbst nach reichlichem Impfen nicht angegriffen. Auf Achalmes Eiweißwürfeln in Wasser, selbst nach Einimpfen von 1—2 cm aus einer frischen Bouillonkultur, kein Wachstum, bzw. Lösung des Eiweiß, in Bouillon + Eiweißwürfel Wachstum, jedoch auch nach wiederholter Überimpfung in ähnlichem Nährboden keine Lösung. Obligat anaërob; aërob kein Wachstum. —

Der Bacillus steht offenbar dem köpfchensporenbildenden Bac. paraputrificus sehr nahe, der, wie der unsere, die Milch zum Gerinnen bringt, ohne daß aber eine Proteolyse folgt, obwohl er sonst stinkende Eiweißfäulnis erregt, was, wie wir sehen, der unsere (in Gelatine, Pepton, Eiweißwürfeln) nicht tut. Nach L. et N. ist B. paraputrificus denaturierbar, verliert seine Fäulniseigenschaften und wird so zum Bac. phlegm. emphysematose, (B. saccharobut. immol.), dessen plumpe, unbewegliche Stäbchen mit mittel- und endständigen Sporen jedoch gar nicht den unseren gleichen. Auch verflüssigt derselbe Gelatine und gedeiht am besten nur auf Zucker oder Stärke enthaltenden Nährböden. —

Vom Bac. amylobacter unterscheidet sich unser Bacillus in der Größe, die entschieden andere Form der Sporangie, bildet Sporen nur in Fleischwassernährböden, nicht auf zuckerhaltigen, wächst in Gelatine, in Bouillon Gasbildung. —

Unser Bacillus hat die Vorliebe, nur auf zuckerfreien Nährböden zu sporulieren und in Bouillon Gas zu erzeugen; von Milchzuckeragar auf Milchzuckeragar geimpft, wächst er mit der Zeit immer schlechter und schlechter und läßt, wenn auch eine Überführung in eine Fäulnisform nicht gelang, unverkennbar seine Abstammung von den anaëroben Fäulniserregern erkennen. Er bildet also, wie Paraputrificus, einen Übergang zwischen den Putrificus und Amylobacterarten; wir wollen ihn Bac. parabutyricus nennen.

II. 222, IV. 222, V a. 222, V b. 222.
XI. 222, XII. 222, XIII. 222.

Schlanke, gestreckte, oft auch geknickte Bazillen, 0,8—1 μ dick, 5—8 μ lang, häufig in Ketten und Fäden. Die Sporen mehr oder weniger endständig, oval, 2 + 1 μ.

Ertragen 80° C, 5—10 Min. lang. Sporangien meist etwas aufgetrieben an der Stelle der Spore. Alle unbeweglich, keine Kapsel, Gram-positiv, sporulieren auf allen Nährböden gut und schnell.

Anaërobe Agarplatte: Die Kolonien wachsen langsam, sind rundlich, flach, glatt, der Rand gelappt, oder auch bei einem Stamme (XI) mit feinen, krausen Härchen besetzt. Bläulich durchscheinend.

---

[1]) Vergl. die Mikrophotographie in Heims Lehrbuch d. Bakt. 1898. Taf. VI.

Agarstrich (nach W. B. verschlossen): Isoliert stehende Kolonien oder schleierartiger, nicht zusammenhängender, glänzender, grau-blau durchscheinender oder durchsichtiger Belag. Starker Gestank.

Agarstich: Wachsen nur im Stichkanal. Ist der Agar nicht nach W. B. verschlossen, so beginnt die Entwicklung nur 1,5—2,0 cm unter der Oberfläche, ist hier aber üppig, kraus, verzweigt, ähnlich einer umgekehrten Pappel.

Agarschüttelkulturen: Große, fein verzweigte, schneekristallförmige Kolonien.

Gelatinestich: Nur die Fleischwassergelatinekulturen gehen an. Die Verflüssigung beginnt entlang dem Stichkanal bereits am 3. Tage strumpfförmig und ist oft bereits nach 10 Tagen komplett.

Tabelle III.
Biochemische Eigenschaften der Bazillenstämme.

Bezeichnung	Name	Dextrose	Laktose	Milchgerinn.	Saccharose	Amylum	Fett	Glyzerin	Gelatine	Kaseïn	Nitrat	Ammonia	Indol	H$_2$S	Farbe	Anmerkung
		Spaltung										Produktion				
III. 201	Bac. fusiformis	—	—	.	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	grau	
III. 202	Bac. pumilus	+	—	.	+	—	+	+	+	+	—	±	—	+	gr. o. cr.	
I. 203	Bac. lut. sporogen.	+	+	.	+	+	—	+	+	+	—	+	—	+	gelb	
III. IV. 204	Bac. asterosporus	+ Gas	+ Gas	.	+ Gas	+	—	+ Gas	+	+	—	—	—	—	grau	
I. 205	Bac. gravidus	+	—	.	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	grau	
II. 206	Bac. teres	+	—	.	+	—	+	+	+	+	—	+	—	±	grau	
II. 207	Bac. parvus	+	+	.	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	gelblich-grau	
IV. 208	Bac. silvaticus	+	—	.	—	—	±	—	±	±	—	±	—	±	grau	Kartoffelkultur: gelblich-braun
I. 209	Bac. submergeus	+	—	.	—	—	—	±	±	+	—	+	—	+	gelb-braun	
I. 210	Bac. aterrimus	±	+	.	±	—	—	+	+	+	+	+	—	—	grau-braun schwarz	
I. II. III. IV. Va. Vb. 211 a —	Bac. mesentericus vulgatus	+	—	.	+	+	+	∓	+	+	+	+	—	±	gelblich-crême u. rauchig-weiß	
V. 212	Bac. exilis	+	±	.	+	—	—	—	+	+	+	+	—	—	grau	
II. 213	Bac. cerasinus	+	—	.	—	—	+	—	+	+	—	±	—	—	rosa	
I. II. III. Va. Vb. 214	Bac. cirrhosus	+	—	.	+	—	+	∓	+	+	+	+	—	±	grau mit weißen Inseln	
III. Va. 220	Bac. amylobacter v. immob.	+ Gas	+ Gas	+ Gas	+ Gas	.	.	.	—	—	.	.	—	+	grau	
III. Va. 221	Bac. parabutyricus	+ Gas	+ Gas	+ Gas	+ Gas	.	.	.	—	—	.	.	—	+	grau	
II. IV. Va. Vb. XI. XII. XIII. 222	Bac. indolicus	±	= +	—	—	—	+	—	+	+	= +	+		+	grau	

NB.: + = immer vorhanden; ± = in Spuren; ∓ = bei einigen Stämmen vorhanden bei anderen nicht; — = nicht vorhanden.

Peptonmolken und Bouillon (nach W. B. verschlossen): Diffus getrübt, später klärt sich der Nährboden; reichlicher, schleimiger, beim Aufwirbeln wasserhosenartig aufsteigender Bodensatz. Geruch penetrant.

Milch: Ohne zu gerinnen, erfolgt bei alkalischer Reaktion unter penetrantem Geruch eine Kaseïnhydrolyse. Nach 8—10 Tagen ist die Milch bereits ganz in eine gelbe, trübe Flüssigkeit umgeändert.

Biochemisches Verhalten: In Dextrose, -Laktose-, Saccharose- und Glyzerin-Nährlösungen kann man mit der befolgten Methode, da das aus dem Pepton gebildete Ammoniak die eventuell vorhandene Säure schnell neutralisiert, diese nicht recht nachweisen. Am wahrscheinlichsten ist Säurebildung aus Dextrose. In Agarschüttelkulturen der drei Zucker und Glyzerin reißt der Agar hier und da, was jedoch auch die Folge von Fäulnisgasen sein kann.

Nitrate werden von zwei Stämmen reduziert, von den anderen nicht; Ammonia ist immer vorhanden, wohl aber nicht über Nitrit entstanden, sondern aus Pepton, da in der Nährlösung die Nitrate noch nachweisbar sind. Amylase nicht vorhanden. Sämtliche Stämme sind kräftige Fettspalter und bei allen findet man Indol und H_2S reichlich in den Bouillonkulturen. Achalmes Eiweißwürfel in sterilem Wasser werden aufgelöst. Obligat anaërob.

Speziesbestimmung: Die beschriebenen Mikroben gehören offenbar zur Gruppe des Bac. putrificus Bienstock. Als besonders auffallende Unterschiede wären zu vermerken, daß keiner der Stämme beweglich ist, daß sie keine trommelschlägelförmige Sporangien haben und daß sie alle sehr kräftige Indol-Produzenten sind; sie gleichen in dieser Beziehung also eher dem Bac. perfringens (Fränkel[1]), Bac. bifermentans sporogenes (Tissier et Martelly[2]), Clostridium foetidum carnis (Salus[3]) und dem Bac. saprogenes carnis (Salus), die ebenfalls Indolproduzenten sind. Unter diesen ist Bac. perfringens ein starker Zuckervergärer, bildet Säure aus Glykose, Laktose, besitzt Amylase; Bac. saprogenes carnis besitzt trommelschlägelförmige Sporen (am Ende aufsitzend), ist lebhaft beweglich, die Milchkulturen reagieren sauer und riechen nach Buttersäure; Clostridium foetidum carnis (Salus) ist beweglich, wächst glasbürstenartig in Gelatine, koaguliert Milch. Der Bac. bifermentans sporogenes besitzt nach Tissier keine flockigen (Schneekristalle), sondern linsenförmige Kolonien, wächst nur bei Gegenwart von Zucker; Kaseïn scheidet sich in feinen Flocken aus, bevor die Peptonisierung beginnt. Auf Grund der genannten Unterschiede belegen wir die oben beschriebenen Anaëroben mit dem Namen Bac. indolicus n. sp.

Aktinomyces.

I. 251, II. 251, III. 251, IV. 251, V a 251.

Lange, schlanke, verzweigte, nach Gram färbbare, unbewegliche, ungegliederte, krause, durcheinander gelagerte Fäden.

Agarplatte: Die Kolonien gehen gut an. Unregelmäßig oder rund, konvex oder brustwarzenförmig, glattrandig, seltener mit Härchen besetzt. Anfangs glatt, glänzend, mit Ringen auf der Oberfläche, seltener gefältelt, später weiß, wie mit Mehl bestäubt. Später wird der Staub grau. Knorpelige, harte Konsistenz.

Agarstrich: Meist sieht man eine Reihe der soeben beschriebenen Kolonien, ein andermal einen reichen, sich ausbreitenden, ungleich erhabenen oder gerunzelten Belag; die weißen Sporen erscheinen nur in dem oberen, trockenen Teil des Agars. Der Agar wird braun; Geruch nach Humus.

Gelatinestich: Kräftiges Oberflächenwachstum, im Stichkanal schwach, gleich einer umgekehrten Fahne. Schalen-, später trichterförmige, endlich zylindrische Verflüssigung.

Peptonmolken und Bouillon: Kann sich nur selten auf der Oberfläche festsetzen und bildet dann eine feste Haut. Meist finden sich am Boden schöne, kugelrunde Flocken.

---

[1] Wir bemerken hier, daß, obwohl im Käse No. 2 einer der oben beschriebenen Stämme immer in großer Zahl zu finden war und er offenbar daher einen schlechten, putriden Geruch hatte, es nicht gelang, Indol in demselben nachzuweisen, was mit Simmitzkys Beobachtung übereinstimmt, daß bei Gegenwart von Säure bei anaërober Eiweißzersetzung es nicht bis zur Bildung von Indol, Scatol usw. kommt.

[2] Vergl. C. Salus, Arch. f. Hyg. LI. 1904. p. 97.

[3] Vergl. Tissier et Martelly, Ann. de l'Instit. Pasteur. XVI. 1912. p. 866.

Kartoffel: Wie der Agarstrichbelag, die Kartoffel wird graugrünlich verfärbt.

Milch: Gerinnt meist zuerst und löst sich dann langsam auf. Die Kultur ist gelbrötlich gefärbt.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose manchmal in Spuren Säure, aus Laktose, Saccharose niemals; Glyzerin keine Säure; Nitrate werden reduziert; Ammonia, H_2S nachweisbar, aber nicht Indol und Amylase; Lipase nicht untersucht.

Speziesbestimmung: Offenbar Act. chromogenes (Gasperini) oder Streptothrix odorifera (Rullmann).

III. 252.

Dünne, lange, verzweigte, Gram-positive, unbewegliche, ungegliederte, sporenbildende Fäden.

Agarplatte: Kolonien konisch oder kraterförmig, glattrandig, hart knorpelig.

Agarstrich: Eine Reihe von Kolonien. Kein Geruch. Farbe gelb, später weiß.

Gelatinestich: Gut auf der Oberfläche, im Stichkanal ästchenbildend. Verflüssigung bleibt schütteltrichterförmig.

Peptonmolken: Am Boden kugelrunde, weiße, gefiederte Flocken.

Kartoffel: Wächst mäßig gut in Form warzenartig erhabener Kolonien. Kein Geruch.

Milch gerinnt, alkalisch, löst sich langsam auf, Ringbildung.

Biochemisches Verhalten: Aus Dextrose Säure, aus den anderen zwei Zuckern und Glyzerin nicht; Nitrate werden reduziert, H_2S vorhanden, Amylase, Indol, Ammonia nicht. Farbstoff: Schön gelb gefärbt, später weiß eingestäubt. Der Nährboden unverändert.

Speziesbestimmung: Eine Actinomycesart, die in mehreren Punkten von der vorher beschriebenen abweicht. Vielleicht identisch mit einer der gelben Actinomyceten Gasperinis und Rossi-Dorias (conf. L. et N.).

Oidium.

I. 351, II. 351, III. 351, IV. 351, V a. 351, V b. 351.

Oidium lactis (Fresenius).

Die Morphologie der verschiedenen, in unsere Hände geratenen Stämme wich in nichts von der des wohl bekannten Oidium lactis ab.

Betreffend des biochemischen Verhaltens bemerken wir folgendes: Aus Dextrose wird ein wenig Säure gebildet, in Laktose und Saccharose konnten wir solche nicht beobachten, aus Glyzerin jedoch bei den meisten. Eiweiß spalteten alle. Nach 6 Wochen wird die Gelatine weich oder dickflüssig. Kaseïnhydrolyse ist immer am besten auf Eijkmans Milchagar nachzuweisen, da die Oidien in der Magermilch sich auf der Oberfläche meist nicht ansiedeln können.

Fettspaltung: Es sind alle kräftige Fettspalter.

Amylase: Fand sich bei einem Stamm in Spuren; Nitratreduktion, H_2S, Ammonia usw. nicht.

Sproßpilze.

Stämme: I a, II a—f, III a, IV a—b, V a, a, V b a—c.

Wir gingen nicht näher auf das Studium der aus den Käsen isolierten Sproßpilze ein und begnügen uns hier mit der Aufzählung folgender Eigenschaften:

Die Form der Zellen ändert sich nach den Stämmen nicht viel. Die meisten sind rundlich bis rund, also von typischer Torula-Form. Zur Beobachtung gelangten jedoch auch größere, ovale Zellen. Den Nachweis der Sporenbildung versuchten wir sowohl in einer dünnen Wasserschicht (im Erlenmeyerkölbchen), wie auch auf Hansens Gipsblöcken wiederholt bei 20, 25 und 30° C, also bei einer Temperatur, bei welcher die meisten Saccharomyceten zu sporulieren pflegen. Es kamen hierbei immer frische, in Dextrosenährlösung oder Peptonmolken gezüchtete Kulturen zur Verwendung. Zur Ausschließung von Fettkügelchen benützten wir Osmiumsäure. Nie fanden wir jedoch Sporen, daher sind unsere Sproßpilze aus dem Liptauer als Torulae anzusehen.

Hervorheben wollen wir noch folgendes: Die meisten Torula-Stämme gedeihen auch fakultativ anaërob leidlich gut; es wäre daher ihr Wachsen im Käse gut möglich.

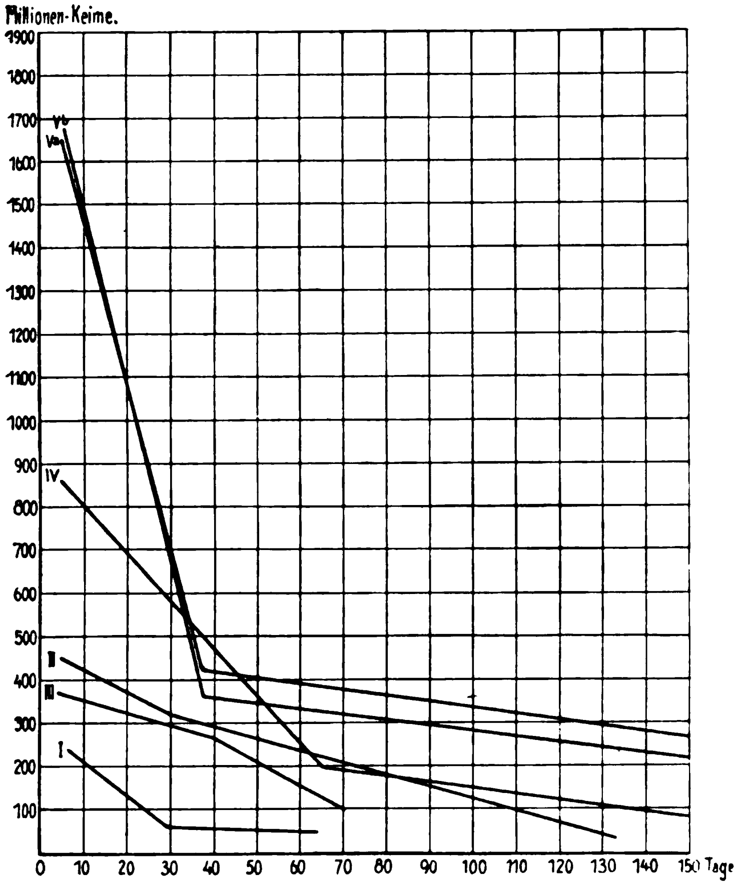
Milchzucker greifen die wenigsten (2 Stämme) an. Interessant ist und daher hervorzuheben, daß verhältnismäßig viele — etwa ⅓ der Stämme — Fett kräftig zu spalten vermögen, jedoch nur drei auch Glyzerin weiterspalten.

Kaseïn spalten auch einige Stämme, was besonders auf Eijkmans Milchagarplatten gut zu sehen ist. In alten Gelatinekulturen bemerkt man immer Verflüssigung.

VI. Quantitative und qualitative Ergebnisse der Untersuchungen.

Zahl, Art und Häufigkeit der isolierten Mikroben.

Es wäre von Interesse gewesen, die Zahl der Keime vom Tage der Bereitung des Gomolyakäses an zu verfolgen. Die Besonderheit der Bereitungsweise des Liptauer Käses läßt jedoch solche Keimzählungen nicht leicht zu, da der Liptauer aus einer Anzahl „Gomolya"-Käse verschiedener Provenienz bereitet wird, und zwar werden Käse ungleichen Alters (8—10—12 Tage) und gereift unter recht ungleichen Reifungsbedingungen verarbeitet. Wollte man also vom ersten Tage ab das Verhalten der Keimzahl verfolgen, so ist das nicht so einfach zu verwirklichen, wie bei anderen Käsesorten, wo wir nur in gewissen Zeitintervallen Proben zu Keimzählungen aus demselben Käseleibe zu entnehmen brauchen. Man müßte beim Liptauer zuerst im „Rohmaterial" in einer großen Anzahl von Gomolyakäse, bereits in den Schäfereien, die Zahl der Keime bestimmen und dann die Zählungen in dem aus demselben „Rohmaterial" bereiteten, fertigen Produkt fortsetzen. Auf diese Weise würden wir vielleicht auch gefunden haben, daß die Keimzahl, wie bei anderen Käsesorten, als Folge der Vermehrung kurz nach der Bereitung ansteigt und vielleicht auch, daß das Manipulieren mit den Käsen während der Be-



Kurve 1. Die Abnahme der Gesamtkeimzahl.

reitung des Liptauers die Keimzahl vermehrt. Da jedoch der nächste Betrieb eine halbe Tagesreise weit vom Institut und die Schäfereien noch entlegener waren, konnten wir an die Ausführung solcher Zählungen nicht denken und mußten uns begnügen, die Keimzahlbestimmungen in fertigen, einige Tage alten Liptauer Käsen zu beginnen. Diese Keimzählungen waren besonders in bezug auf das Scharfwerden des Liptauers von Interesse. Man konnte ja annehmen, daß, wie wir weiter oben erörtert, in demselben eine Keimzunahme stattfindet.

Die Ergebnisse der Zählungen folgen in Tabelle IV auf p. 516. Das Verhalten des Gesamtkeimgehaltes haben wir des weiteren auch graphisch dargestellt (siehe p. 514).

Betrachten wir den Gesamtkeimgehalt des Liptauer Käses und vergleichen denselben mit dem anderer Käse, so fällt uns vor allem auf, wie hoch die Keimzahl im ersteren im Verhältnis zu Käsen gleichen Alters anderer Sorten ist. Thöni[1]) fand als höchste Keimzahl im Emmentaler normaler Größe 400 Millionen, und auch diese auch nur bei ganz jungen, 1 Tag alten Käsen. Die späteren Zahlen bleiben mit wenigen Ausnahmen alle unter 100 Millionen. Die Keimzahl im Cheddarkäse überschreitet nach Harding und Pruchа[2]) nicht um vieles 100 Millionen, meist bleibt sie unterhalb der genannten Zahl. Einzig beim schwedischen Güterkäse fand Troili-Petterson[3]) eine Keimzahl, die mit der des Liptauers wetteifert.

Zur Erklärung des hohen Keimgehaltes erscheint es uns in erster Linie wichtig, zu erwähnen, daß wir mit Agarplatten bei 30° gearbeitet haben, die genannten Forscher aber mit Gelatine. Thöni benutzte wohl auch Agarschüttelkulturen zur Zählung, jedoch lassen sich die so erhaltenen Zahlen nicht mit den auf Platten erhaltenen vergleichen, da auf letzteren auch Kolonien aërober Keime angehen und gezählt werden. Andererseits mag der hohe Keimgehalt auch eine Folge der Käsebereitungstechnik sein. Inwiefern dies der Fall, das sagen unsere Zahlen — aus oben erwähnten Ursachen — leider nicht. Einzig bei dem letzten Käse No. 5 b, der die für den Winter übliche Menge (5 Proz.) Salz erhalten, sonst aber mit Käse No. 5 a gleichzeitig bereitet wurde, sehen wir, daß derselbe um fast 500 Millionen mehr Keime enthält. Vielleicht ist diese Differenz der größeren Salzmenge zuzuschreiben.

Sicher ist weiter, daß der Liptauer schon als Naturlabkäse an und für sich reicher an Mikroben ist wie ein Kunstlabkäse. Thöni fand Unterschiede zwischen Natur- und Kunstlab-Emmentaler.

Ein Zusammenhang zwischen dem Keimgehalt und Scharfwerden, bzw. der starken Fettspaltung des Liptauer Käses läßt sich, wie wir sehen, nicht feststellen. Derselbe ist nicht größer in den scharfen wie in dem normalen. Auch nimmt die Keimzahl in den scharfen oder nicht scharfen Käsen nicht schneller ab. Ob der im Verhältnis zu den anderen auffallend hohe Keimgehalt des Herbstkäses No. 5 a und dessen klebrige Konsistenz im Zusammenhang steht, läßt sich nicht sagen.

In der Zeitperiode, wo die Käse untersucht wurden, ist, wie wir weiter sehen, nur noch eine Abnahme der Keimzahl zu konstatieren. Diese geht im ersten Monat rasch vor sich, um sich später zu verlangsamen. Nach ungefähr einem Monat sind in allen Käsen zumeist nur noch 200—400 Millionen

---

[1]) Landw. Jahrb. d. Schweiz XXIII. 1909. p. 413.

[2]) New York Exp. Stat. Geneva Techn. Bull. No. 8. p. 187.

[3]) Centralbl. f. Bakter. Abt. II. Bd. 11. 1903.

Tabelle IV.

Zahl der Keime in den untersuchten Käsen.

Liptauer Käse				Mikrobenzahl							Anmerkung
				in 1 g nicht pasteurisierten Käse					im pasteurisierten Käse		
No.	Bezogen am	Herkunft	Alter in Tagen bei den Untersuchungen[1])	Gesamtkeimzahl (Peptonmolkenagarplatten)	Tägl. Abnahme der Keime in % d. Gesamtkeimzahl	Säurebildende Keime	Oidium lactis	Sproßpilze	Aërobe Bazillen	Anaërobe Bazillen	
1	1912 30./V.	Rozsahegy	6	247 200 000	—	nicht zählbar	+	+	+ zerfloss.	—	
			29	68 400 000	—	47 000 000	—	+	800	—	
			64	56 400 000	1,2	32 000 000	—	—	+ zerfloss.	—	Wird scharf
2	19./VI.	Zólyom	6	452 000 000	—	154 000 000	+	+	+ zerfloss.	+	
			30	329 600 000	—	nicht zählbar	+	+	520	+	
			50	278 000 000	—	nicht zählbar	+	—	400	+	
			133	37 600 000	0,68	27 200 000	—	—	+ zerfließt	+	Wird scharf
3	12./VII.	Dobó	4	384 400 000	—	nicht zählbar	+	+	+ zerfließt	—	
			40	247 600 000	—	nicht zählbar	+	+	160	—	
			71	109 000 000	1,0	39 200 000	—	+	+ zerfließt	+	
4	8./VIII.	Gyömberhavas	6	866 000 000	—	358 000 000	—	+	520	—	
			66	206 000 000	—	116 000 000	—	+	280	—	
			152	86 000 000	0,59	54 000 000	—	—	+ zerfließt	+	Wird scharf
5 a	30./IX.	Rozsahegy	6	1 165 000 000	—	nicht zählbar	+	+	+ zerfließt	—	
			38	nicht zählbar	—	340 000 000	—	+	3840	—	
			152	252 000 000	0,51	nicht zählbar	—	—	325	+	
5 b	30./IX.	Rozsahegy (enthält 5% Salz)	6	1 685 000 000	—	nicht zählbar	+	+	+ zerfließt	—	
			38	360 000 000	—	244 000 000	—	+	1,112	—	
			151	228 000 000	0,58	142 000 000	—	—	+ zerfließt	+	

---

[1]) **Das Alter ist vom Tag der Liptauerbereitung gemeint, da der „gomolya“ etwa 8—12 Tage alt ist, wenn er zur Verarbeitung gelangt; so wäre diese Zeit hinzuzurechnen, um so das eigentliche Alter zu erlangen.**

Tabelle V.

Die Mikroben der untersuchten Liptauer Proben nach den Käseproben geordnet.

	Käse																			Wie oft gefunden?			Gefunden in 19 Untersuchungen
	No. I			No. II				No. III			No. IV			No. Va			No. Vb						
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	Untersuchung																						
Mikrokokken:																							
M. pyogenes α aureus (Rosenb.)	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	2	1	0	3
M. acidi lactis Krüger	.	+	+	+	.	+	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	2	2	4	8
M. radiatus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
M. luteus Cohn em. L. et N.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	2	0	2	4
M. lactis acidi Leichmann	+	.	+	+	.	.	.	+	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+	4	1	3	8
M. lactis acidi Marpmann	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	.	.	.	2	1	3	6
M. umbilicatus	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	1	2
M. chromoflavus	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	2	0	0	3
M. candicans	.	.	.	+	+	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	1	3	3	7
M. rosettaceus	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	+	1	0	2	4
M. versicolor	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	0	0	1	1
M. sulfureus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	2	2
M. aurantiacus	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	0	3
M. roseus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	0	1	1	2
Sarcina:																							
Sarcina lutea	.	+	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	1	2	1	4
Streptokokken:																							
Streptococcus lactis Lister	+	+	.	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	6	4	17
Bakterien:																							
Bact. caseï Leichmann	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	6	6	19
Bact. acidi propionici v. ruber	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	.	.	1
Bact. lactis innocuum	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	2
Bact. fluorescens	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. putidum	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bact. turcosum	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	+	2	2	2	7
Bact. helvolum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. cremoides	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	2
Bact. ochraceum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. saponificans n. sp.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	0	2
Bact. adipis n. sp.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bact. fulvum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. chrysogloea	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. lateritium	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. rufum n. sp.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bazillen:																							
Bac. fusiformis	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. pumilus	.	.	+	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	2	3
Bac. luteus sporogenes	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bact. asterosporus	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	1	1	1	3
Bac. gravidus n. sp.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	1	2
Bac. teres	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. parvus	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. silvaticus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bac. submergens n. sp.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. aterrimus	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. mesentericus vulgatus	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	.	+	+	4	5	6	16
Bac. exilis n. sp.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1

Tabelle V (Fortsetzung).

	Käse																			Wie oft gefunden?			Gefunden in 19 Untersuchungen
	No. I			No. II				No. III			No. IV			No. Va			No. Vb						
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	Untersuchung																						
Bac. cerasinus n. sp.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bac. cirrosus n. sp.	+	.	+	+	.	.	+	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	2	2	9	9
Bac. amylobacter v. immob.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	0	1	1	2
Bac. parabutyricus n. sp.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
Bac. indolicus n. sp.	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	1	1	4	7
Actinomyces:																							
Act. odorifera	.	+	+	.	+	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	.	.	+	.	0	5	2	7
Act. flava	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Sproßpilze:																							
Torulae	+	+	.	+	+	.	.	+	+	+	+	.	.	+	+	.	+	+	.	6	5	1	12
Oidium:																							
Oidium lactis	+	.	.	+	.	+	.	+	+	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	6	1	1	8

Keime am Leben. Berechnen wir nun die auf einen Tag entfallende Zahl der absterbenden Keime in Prozenten der Gesamtkeimzahl, so sehen wir, daß die Keimabnahme in den keimreichsten Käsen No. 5 a und b am geringsten ist; in den Käsen No. 2 und 4 mit mittlerer Keimzahl etwas größer und in den keimärmsten am größten ist. In dem mit 5 Proz. Salz gesalzenen Käse No. 5 b ist die Keimabnahme nicht um vieles größer, als in demselben Käse mit 0,5 Proz. Salz. Letzteres ruft also keinen schnelleren Keimtod hervor, da bekanntlich das Salz, selbst in stärkeren Lösungen, wie angegeben, keine große bakterizide Wirkung hat.

Betrachten wir nun die qualitativen Zählungen und Häufigkeitskolumnen. Nach Tabelle IV waren die säurebildenden Organismen (zumeist echte Milchsäurebakterien, weniger Mikrokokken und nur wenige andere) nach den Zählungen auf den Kreideplatten meist am reichlichsten von allen anderen vertreten. Beim größten Teil der Proben finden wir, daß 61 Proz. der Keime Milchsäurebakterien sind, jedoch sehen wir auch, daß sie oft nur 36 oder 41 Proz. des Keimgehaltes ausmachen. Es erscheinen diese Zahlen insbesondere dann als niedrige, wenn wir uns daran erinnern, daß in anderen Käsen 70—95 Proz. säurebildender Keime gefunden worden sind.

Wir können dies wohl nur so erklären, daß, infolge der besonderen Bereitungsweise des Liptauer Käses, eine große Zahl anderer Keime, wie Oidium, Sproßpilze, Sporenbildner usw., in den Käse gelangt und die Zahl der Säureorganismen herabgedrückt haben, wodurch sie im Verhältnis zur Gesamtkeimzahl so klein erscheint.

Von den Säurebildnern verdienen wohl Bact. casei und Strept. lactis die größte Aufmerksamkeit. Wie wir der Tabelle V und der graphischen Darstellung (p. 520) entnehmen, fehlt der erstere bei keinen der 19 Untersuchungen der sechs Käse und, wie wir hinzusetzen können, dominierte Bact. casei immer auf den Platten.

Bezüglich des Strept. lactis ist zu bemerken, daß derselbe bei den ersten Untersuchungen, d. h. in den jüngeren Käsen, immer reichlicher vertreten war, als in älteren, wo wir förmlich nach ihm suchen mußten. Er fehlt deshalb auch in den Käsen I und II bei der dritten Untersuchung.

Die säurebildenden Kokken finden wir auch fast konstant bei allen Untersuchungen. Wir können hier die einzelnen Formen zu Typen vereinen und sehen dann, daß ihre Häufigkeitskolumne auch fast die des Strept. lactis und Bact. casei erreicht. Zu vergessen ist hier nicht, daß die Zeit der Kokken, wie wir aus Untersuchungen bei anderen Käsen wissen, eigentlich zeitig vorbei ist; wir fanden sie in den Gomolyas, also jungen Käsen, auch konstant bei einer jeden Untersuchung[1]).

Milchagarplatten legten wir an, um die Zahl der Käsestoff lösenden Mikroben zu zählen. Das Ergebnis befriedigte uns aber nicht, was folgende zwei Beispiele illustrieren sollen:

Käsestoff lösende Kolonien auf den Milchagarplatten bei Käse No. 1:

1. Untersuchung: Ein gelber Kokkus, ein gelbes Stäbchen (eine Kolonie), eine Hefekolonie, Oidium lactis.
2. Untersuchung: Eine Hefekolonie.
3. Untersuchung: Eine Actinomyceskolonie; bei Käse No. III.

1. Untersuchung: Eine Kolonie einer roten Bakterie (Bact. rufum).
2. Untersuchung: Keine Käsestofflöser.
3. Untersuchung: Zwei Kolonien von Sporenbildnern.

Wir finden also gewisse Mikroben als Käsestoff lösende nicht konstant auf den Platten, sondern es handelt sich um Zufallsinfektionen.

Wenn wir nicht aus den Ergebnissen, die bei anderen Käsesorten erhalten wurden, wüßten, daß diese sich ähnlich verhalten, würde uns das Resultat überrascht haben, in Betracht der starken Eiweißspaltung, die mit der Zeit in den Liptauer Käsen stattfindet. Die Zahl der Käsestoff lösenden aus solchen Ergebnissen der Milchagarplatten zu berechnen, wäre selbstredend nicht angezeigt gewesen, und so unterließen wir dies.

Unter den von mehreren Platten isolierten (p. 487) Keimen aus pasteurisiertem und nicht pasteurisiertem Material fanden sich jedoch immer auch Käsestoff lösende. Der größte Teil dieser kommt aber nicht konstant vor, so daß sie als zufällig in den Käse gelangte Keime zu betrachten sind (siehe Graphikon). Jedenfalls weisen diese zwei Tatsachen darauf hin, daß die Käsestoff lösenden Mikroben (Bact. casei rechnen wir nicht mit) nicht in großer Zahl in den Käsen vorhanden sind. Daher bleiben sie bei den großen Verdünnungen, mit denen man hauptsächlich wegen der Milchsäurebakterien arbeiten muß, leicht von den Platten weg.

Als zu den Käsestoff lösenden Mikroben gehörig, müssen wir hier auch der aëroben Bazillen besonders Erwähnung tun. Sie fanden sich bei einer jeden Untersuchung auf den mit pasteurisiertem Käsematerial angelegten Platten. Leider waren die Platten häufig nicht zu zählen, da sich die Bazillen im Kondenswasser ausbreiteten und die Platten verdarben. Trotz des empfohlenen Mittels (Papiereinlagen, die mit Glyzerin getränkt waren) ließ sich dieser größte Fehler der Agarplatten nicht beseitigen. Die erhaltenen Zahlen mit denen der säurebildenden oder der Gesamtkeimzahl zu vergleichen, wäre ohnehin nicht richtig, wie die Zahlen überhaupt nicht viel sagen, da die aus pasteurisiertem Material angelegten Platten nur ein

---

[1]) Centralbl. f. Bakter. Abt. II. Bd. 33. 1912. p. 401.

Die Häufigkeit der isolierten Mikroben in sämtlichen der untersuchten Käse graphisch dargestellt.

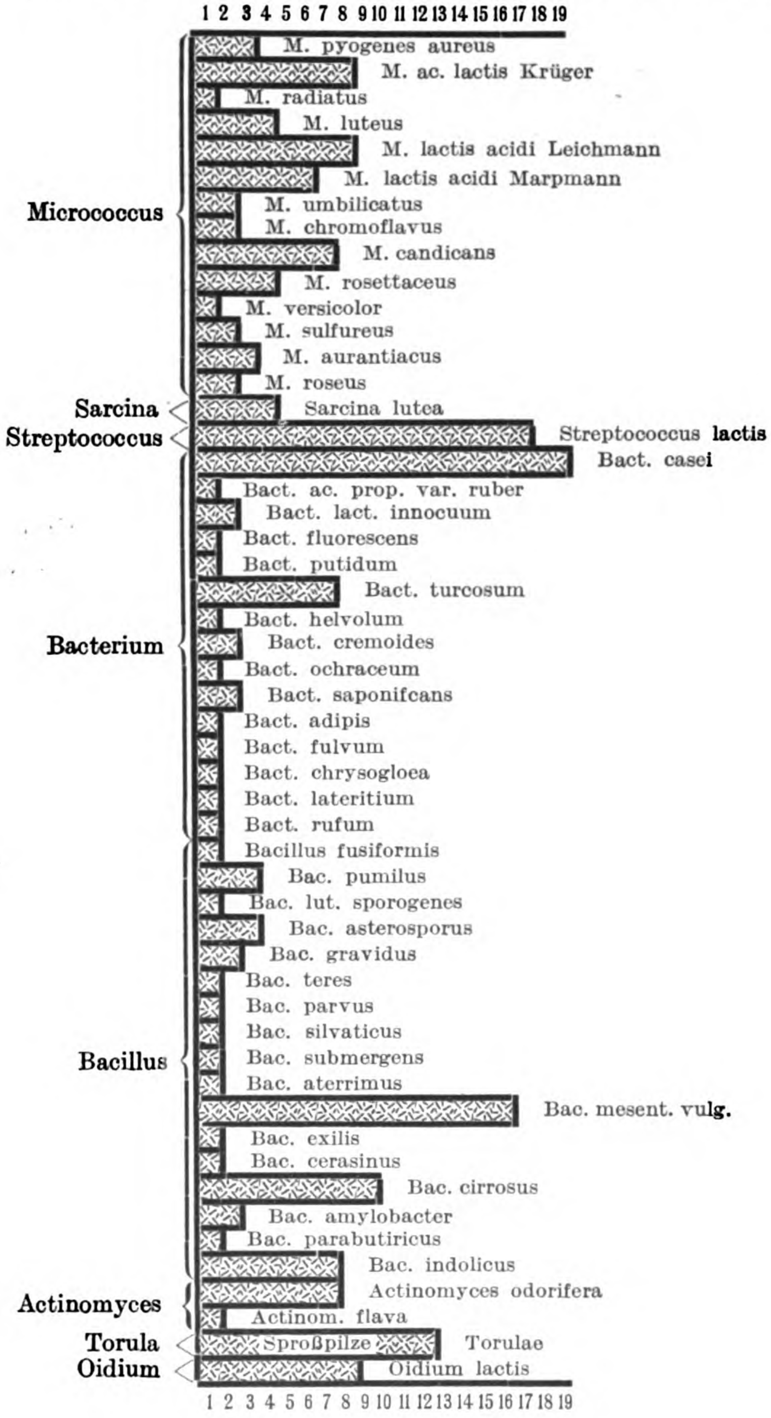


Bild von den anwesenden Sporen, nicht aber auch von der Zahl der vegetativen Formen der aëroben Bazillen geben. Daß auch solche im Käse vorhanden sind, läßt sich mit großer Sicherheit annehmen.

Was nun die Häufigkeit der einzelnen aëroben Bazillen betrifft, so sind, wie wir dem Graphikon auf p. 520 entnehmen können, die nur bei einer, seltener bei zwei und mehr Untersuchungen gefundenen, gewiß nur zufällig in den Käse gelangt. Eine Ausnahme hiervon bildet Bac. cirrhosus, besonders aber Bac. mesentericus vulgatus, dessen Häufigkeitskolumne fast die der Milchsäurebakterien erreicht. Wir kommen hierauf noch zu sprechen.

Bezüglich der Käsestoff lösenden Kokken wollen wir noch darauf aufmerksam machen, daß deren Häufigkeitskolumne, wenn wir wieder die zu einem Typus gehörigen vereinen, eben so hoch wird, wie die des Bac. mesentericus, also gleich nach Bact. casei folgt. Die Fähigkeit des letzteren zur Kaseïnhydrolyse ist mehrfach nachgewiesen und kann heute nicht mehr bestritten werden, weswegen wir denselben auch unter die Käsestoff lösenden Mikroben aufgenommen haben.

Oidium lactis und die Sproßpilze zählten wir nicht, da ihre Zählung noch weniger genau sein kann, wie die Bakterienzählung; wir begnügten uns deshalb damit, bloß ihre An- oder Abwesenheit auf den Platten zu vermerken. Wie wir den Tabellen entnehmen, fand sich bis auf einen Käse Oidium lactis bei den ersten Untersuchungen immer auf den Platten. Selbst in den größten Verdünnungen, die nur $^1/_{2\,000\,000}$ g Käse enthielten, fanden sich immer Oidiumkolonien ein. Nicht so bei den späteren Untersuchungen. Häufig fehlt jedoch Oidium schon nach 5—6 Wochen auf den Platten, gänzlich vermissen wir dasselbe bei noch älteren Käsen. Die Oidien, die sich im Käse im latenten Zustande befinden, sterben also langsam mit den übrigen Mikroben des Käses ab, daher ist ihre Häufigkeitskolumne klein, im Verhältnis zu anderen.

Etwas länger scheinen die Sproßpilze, die in frischen Käsen fast nie fehlen, am Leben zu bleiben. In den 5—6 Wochen alten Käsen sind sie fast immer noch nachweisbar, in 7, 8—10 Wochen alten verschwinden sie jedoch, bis auf einen Fall, wodurch ihre Häufigkeitskolumne ebenfalls verkleinert wird.

Actinomyces odoriferus weist auf eine Infektion der Milch mit Walderde hin und findet sich schon im Gomolyakäse recht häufig. Gewiß gelangen mit demselben zusammen auch viele aërobe Bazillen in den Liptauer.

Über die Anaëroben werden wir sprechen, wenn vom Scharfwerden des Käses die Rede sein wird, dort werden wir uns auch mit den fettspaltenden Mikroben des Liptauer Käses beschäftigen.

VII. Welchen Mikroben ist bei der Reifung des Liptauer Käses eine Bedeutung beizumessen?

Die Beurteilung, ob eine aus Käse isolierte Mikrobe bei der Reifung desselben eine Rolle spielt, hat große Schwierigkeiten. Es stehen uns hierzu mehrere Wege offen. Bezüglich des Emmentaler Käses stellte Freudenreich am Anfang seiner Untersuchungen die These auf, daß diejenige Gruppe von Organismen, welche sich im reifen oder reifenden Käse in größter Menge findet, auch diejenige sei, der die Reifung zugeschrieben werden müsse[1]). Freudenreich selbst begnügte sich jedoch nicht damit, sondern führte auch sonstiges reichliches, durch Versuche erhaltenes Beweismaterial an zum Beweise, daß die Milchsäurebakterien die Reifungserreger des Emmentaler sind.

---

[1]) Zit. nach Weigmann in Lafars Handbuch. Bd. 2. p. 74.

Die genannte These wurde seither bei bakteriologischen Käseuntersuchungen öfters angewendet. So schreiben ähnlich jüngst auch Hastings, Evans und Hart[1]): „The constant presence in large numbers is the only certain proof of the importance of an organism or group of organisms in the ripening of any cheese."

Neben dem konstanten Vorkommen in großer Zahl gibt es noch andere Wege zur Beurteilung der Frage, welchen Mikroben bei der Reifung eines Käses eine Rolle beizumessen ist. Wir müssen uns auch noch nach einem solchen umsehen, da uns die genannte These beim Liptauer Käse, da derselbe einer nachträglichen Infektion ausgesetzt ist, leicht irreführen kann, wie wir dies später erfahren werden.

Der Weg der Käsebereitung mit Reinkulturen der fraglichen Mikroorganismen in keimarmer oder keimfreier Milch blieb für uns verschlossen, da wir leider noch nicht über eine Versuchsmolkerei verfügen, in die Praxis mit solchen Versuchen zu gehen, aber nicht leicht ist.

Als letzter Weg blieb also für uns nur der offen, auf Grund der Lebensbedingungen und biologischen Eigenschaften der Mikroben auf ihre Rolle im Käse zu folgern, indem wir diejenigen, die die nötigen Lebens- und Wirkungsbedingungen im Käse nicht finden und über die zur Beteiligung an der Käsereifung nötigen biologischen Eigenschaften nicht verfügen, ausschließen, die übrigbleibenden aber, als für die Käsereifung bedeutungsvoll, behalten. Hier wären bei einem jeden Mikroben bzw. jeder Gruppe hauptsächlich drei mehr oder weniger zusammenhängende Fragen zu beantworten.

1. Sind die Mikroben oder ihre Enzyme überhaupt fähig, einen der drei Hauptbestandteile des frischen Käses (Kaseïn, Fett, Milchzucker) oder deren Abbauprodukte anzugreifen?
2. Entsprechen die Verhältnisse im Käse, insbesondere was Luft- und Reaktionsbedürfnisse anbelangt, den betreffenden Mikroben? Können dieselben sich in irgendeinem Zeitpunkte der Reife im Käse überhaupt vermehren?
3. Sind im Käse die Verhältnisse für die Enzyme der fraglichen Mikroorganismen überhaupt passende, d. h., sind nicht etwa Paralysatoren vorhanden, wodurch die Entfaltung der Enzymtätigkeit verhindert wird?

Die ersten zwei Fragen lassen sich auf Grund unserer Untersuchungsergebnisse zum größten Teile beantworten. Die Frage 2 wird des weiteren im großen und ganzen zu demselben Resultat führen, wie die Freudenreichsche These, da sich diejenigen Mikroben am meisten finden werden, denen die Verhältnisse am besten passen. Jedoch würde die dritte Frage besonders schwierige Untersuchungen erfordern und ist bis auf einige Mikrobengruppen, da bereits entsprechende Untersuchungen vorliegen, nicht immer zu beantworten.

Versuchen wir es, auf diesem Wege zu den für die Reifung des Liptauers bedeutungsvollen Mikroben zu gelangen, betrachten wir zu diesem Zwecke von dem genannten Standpunkte aus die Tabellen V und VI und ziehen auch die graphischen Darstellungen auf p. 520, 527 und 528 zu Rate.

Wir können auf Grund des unkonstanten Vorkommens in geringer Zahl viele Mikroben als für die Reifung bedeutungslos ausschließen. So, ausge-

---

[1]) The Bacteriology of Cheddar Cheese. (U. St. Dep. of Agr. Bull. 150. 1912. p. 52.)

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle VI.

Die Mikroben der untersuchten Liptauer Proben, geordnet nach Käsen und ihrem Verhalten Milchzucker, Fett, Glyzerin und Kaseïn gegenüber.

	Käse																			Wie oft gefunden?			Gefunden in 19 Untersuchungen
	No. I			No. II				No. III			No. IV			No. Va			No. Vb						
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	Untersuchung																						
Milchzuckerspalter:																							
Microc. pyogenes α aureus	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	2	1	0	3
Microc. acidi lactis Krüger	.	+	+	+	.	+	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	2	2	3	8
Microc. luteus	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	2	0	2	4
Microc. lactis acidi Leichm.	+	.	+	.	.	.	.	+	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+	3	1	2	6
Microc. lactis acidi Marpm.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	2	2	2	6
Microc. umbilicatus	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	1	2
Streptoc. lactis Lister	+	+	.	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	6	4	17
Bact. caseï Leichm.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	6	6	19
Bact. turcosum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	+	1	2	2	5
Bact. helvolum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. saponificans	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	0	2
Bact. chrysogloea	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. asterosporus	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	1	1	1	3
Bac. parvus	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. aterrimus	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. mesentericus vulgatus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	+	.	.	2	0	1	3
Bac. amylobacter	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	0	1	1	2
Torulae	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	2	0	0	2
Fettspalter:																							
Microc. pyogenes α aureus	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	2	0	0	2
Microc. chromoflavus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Microc. candicans	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	0	2	3	5
Microc. rosettaceus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	0	0	1	1
Microc. aurantiacus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. fluorescens	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. putidum	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bact. cremoides	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	2
Bact. saponificans	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	0	2
Bact. adipis	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bact. lateritium	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. pumilus	.	.	+	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	2	3
Bac. gravidus	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	1	2
Bac. teres	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. parvus	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. silvaticus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bac. mesentericus vulgatus	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	.	+	+	4	5	6	16
Bac. cirrosus	+	.	.	+	.	.	+	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	2	2	3	8
Bac. indolicus	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	1	1	4	7
Torulae	+	.	.	+	+	.	.	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+	.	.	5	2	1	8
Oidium lactis	+	.	.	+	.	+	.	+	+	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	6	1	1	8
Glyzerinspalter:																							
Microc. pyogenes α aureus	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	2	1	0	3
Microc. acidi lactici Krüger	.	+	+	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	2	4
Microc. luteus	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	0	1	3
Microc. lactis acidi Leichm.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	1	0	2	3
Microc. lactis acidi Marpm.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	+	+	.	+	.	.	.	.	.	.	2	1	3	6
Microc. candicans	.	.	.	.	+	.	.	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	0	3	3	6
Microc. rosettaceus	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	0	1

Tabelle VI (Fortsetzung).

	Käse																			Wie oft gefunden?			Gefunden in 19 Untersuchungen
	No. I			No. II				No. III			No. IV			No. Va			No. Vb						
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	Untersuchung																						
Microc. sulfureus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Streptoc. lactis	+	+	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	1	0	4
Bact. caseï Leichm.	+	+	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	3	2	1	7
Bact. saponificans	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	0	2
Bact. chrysogloea	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. pumilus	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	2	3
Bac. asterosporus	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	1	1	1	3
Bac. teres	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. parvus	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. mesentericus vulgatus	.	.	.	.	+	.	+	+	+	+	+	+	.	+	+	.	.	+	.	3	4	2	19
Bac. cirrosus	.	.	.	.	.	.	+	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	0	2	4	7
Bac. amylobacter	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	0	1	1	2
Torulae	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Oidium lactis	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Kaseinspalter:																							
Microc. pyogenes α aureus	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	2	1	0	3
Microc. acidi lactis Krüger	.	+	+	+	.	.	.	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	2	2	3	7
Microc. radiatus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Microc. luteus	+	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	0	1	3
Microc. chromoflavus	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	2	0	0	2
Bact. caseï	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6	6	6	19
Bact. fluorescens	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. helvolum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. ochraceum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. saponificans	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	1	0	2
Bact. adipis	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bact. fulvum	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bact. rufum	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. fusiformis	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. pumilus	.	.	+	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	2	3
Bac. luteus sporogenes	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bac. asterosporus	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	1	1	1	3
Bac. gravidus	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	1	2
Bac. teres	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. parvus	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1	0	0	1
Bac. silvaticus	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bac. submergeus	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. aterrimus	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. mesentericus vulgatus	.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	+	+	+	.	+	+	4	5	6	16
Bac. exilis	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1	0	1
Bac. cerasinus	.	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	0	1	1
Bac. cirrosus	+	.	+	+	.	.	+	.	+	+	.	.	.	.	+	+	.	.	+	2	2	4	9
Bac. indolicus	.	.	.	+	+	+	+	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	1	1	4	7
Oidium lactis	+	.	.	+	.	+	.	+	+	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	6	1	1	8

nommen Bact. casei, sämtliche Bakterien und den größten Teil der aëroben und anaëroben Bazillen, da sie nur sporadisch bei einzelnen Untersuchungen zu finden waren.

Von den Kokken sind einige aus demselben Grunde auszuschließen, einige sind überdies indifferent. Wegen indifferenten Verhaltens den Bestandteilen des Käses gegenüber, können wir ebenfalls einige Bakterien und Hefen streichen.

An der Reifung des Liptauer Käses können, da sie in demselben nicht die nötigen Lebensbedingungen treffen, sich folgende Mikroben unmöglich beteiligen:

Die aëroben Bazillen, welche bei den im Käse herrschenden anaëroben Verhältnissen unmöglich gedeihen können. (Eine Ausnahme bildet der fakultative anaërobe Bac. cirrosus, der jedoch inkonstant zu finden und auch aus noch später auszuführenden Gründen ausgeschlossen werden kann.) Hierzu kommt die bekannte Empfindlichkeit der aëroben Sporenbildner, Säure gegenüber; da die Reaktionsverhältnisse in den Käsen schon frühzeitig sauer (in den Schafkäsereien oft schon die Milch) sind, kann man auch eine zu Beginn der Reifung des „Gomolya“ stattfindende Vermehrung der aëroben Sporenbildner nicht annehmen. Daß selbst nach einer starken Infektion der Milch mit aëroben Sporenbildnern sich diese nicht im Käse vermehren, bewiesen Freudenreichs[1]) Versuche. Aber es wurde auch von den Anhängern der Tyrothrix-Theorie eben auf Grund des Gesagten auch nicht die Tätigkeit der aëroben Bazillen in dem Käse-Innern verfochten, sondern eine Einwirkung von der Käserinde aus.

Die Häufigkeit der aëroben Sporenbildner sagt unserer Ansicht nach nichts anderes, als daß in die Schafmilch leichter Erde gelangt (ein Indikator dafür ist, wie erwähnt, auch Actinomyces odoriferus) und daß das Schafeuter leichter mit Pflanzen in Berührung kommen kann. Hierzu kommt, daß die Gomolyas häufig in Stroh oder Heu verpackt werden und so die Rinde und von da aus auf die erwähnte Weise der Käse infiziert wird.

Auf Grund des Gesagten stürzt auch die große Häufigkeitskolumne des Bac. mesentericus vulgatus zusammen, dessen häufiges Vorkommen überrascht, aber nach dem Gesagten wahrscheinlich nur eine Folge seiner Häufigkeit in der Natur überhaupt ist. Die Häufigkeitskolumne des Bac. mesentericus läßt sich jedoch auch aus anderen Ursachen stürzen.

Wie wir sehen, bauten wir die Häufigkeitskolumnen auf Grund von bei 19 Untersuchungen von sechs Käsen in verschiedenem Alter und verschiedenem Reifungsstadium erhaltenen Ergebnissen auf. Wir sehen weiter, daß zurzeit der Untersuchung der Käse nur noch ein Absterben im Käse stattfindet. Demnach wird die Größe der Häufigkeitskolumne sehr davon abhängen, ob die Mikroben schneller oder langsamer oder vielleicht auch gar nicht im Käse absterben. So wächst auch die Häufigkeitskolumne des Bac. mesentericus, da derselbe als Sporenbildner sämtliche nicht Sporenbildner überleben kann, und es nimmt die des Oidium lactis und der Hefen ab, da sie frühzeitig im Käse absterben (p. 521). Die Größe der Häufigkeitskolumne des Bac. mesentericus ist also kein Beweis dafür, daß derselbe für den Liptauer bedeutungsvoll ist.

Im allgemeinen läßt sich aus dem Gesagten feststellen, daß, wenn wir auf Grund der Häufigkeit des Vorkommens entscheiden wollen, ob ein gewisser Mikrobe einen Anteil an irgendeinem biologischen Prozesse hat, wir nicht vergessen dürfen, daß die Häufigkeitsangaben sich auf Untersuchungen beziehen müssen, die in demselben Stadium des Prozesses ausgeführt worden sind. Wir konnten jedoch diese Regel nicht befolgen, da uns das Scharfwerden des Liptauer besonders interessierte und wir mit dem Umstande rechnen müßten, daß in den scharfen Käsen vielleicht eine Mikrobenvermehrung stattfindet.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Bd. 7. 1901. p. 857; Landw. Jahrb. d. Schweiz. 1902. p. 102.

Sehen wir nur noch, welche Mikroben auf Grund der nicht entsprechenden Verhältnisse zu streichen sind, so werden wir, das Bact. casei ausgenommen, wieder sämtliche Bakterien und diejenigen Kokken streichen müssen, die nur aërob gedeihen. Alle diese haben wir bereits auch auf Grund des spärlichen Vorkommens und wegen ihres indifferenten Verhaltens gestrichen. Sicher ist weiter, daß Oidium lactis und Actinomyces odoriferus als luftbedürftige Organismen im Innern des Liptauers nicht gedeihen können. Von einer Beteiligung des ersteren werden wir jedoch noch zu sprechen haben.

Der Hefen und Anaëroben müssen wir auch noch gedenken. Da uns aber beide noch näher beschäftigen werden, wenn vom Scharfwerden des Liptauers zu sprechen sein wird, bemerken wir hier bloß einiges: Es wird den Hefen, die ja auch fakultativ anaërob gedeihen und häufig vorkommen, insofern sie nicht indifferent sind, eine Bedeutung für den Liptauer nicht abzusprechen sein, da sie überdies es noch vorziehen, auf sauren Nährböden zu wachsen.

Nicht so die Anaëroben! Die Buttersäurebakterien sind selten, die Putrificus-Arten zwar wohl häufig, aber, wie wir sehen werden (p. 542), eher einen verderblichen Einfluß auf den Käse und müssen daher von der Liste der Reifungserreger des Liptauers wegbleiben.

Bisher haben wir auf Grund ihrer Häufigkeit und nicht für sie passender Verhältnisse, zum kleinen Teil auch wegen ihres indifferenten Verhaltens, Mikroben von der Beteiligung an dem Reifungsprozesse des Liptauers ausgeschlossen. Auf Grund der dritten Frage, nämlich, ob den Enzymen der gezüchteten Mikroben die Verhältnisse in dem Liptauer Käse entsprechen, haben wir bisher keine der Mikroben bzw. Gruppen beibehalten, bzw. ausgeschlossen. Wie erwähnt, fehlen uns hierzu die nötigen Unterlagen. Wir wissen bloß von den peptonisierenden Kokken, daß deren Protease bis zu einem gewissen Säuregrad tätig ist, und wieder von den aëroben Sporenbildnern, daß deren Enzym trypsinartig[1]) ist, also durch Gegenwart von Säure in seiner Tätigkeit gehindert wird.

Die oben aus anderen Ursachen gestrichenen aëroben Bazillen können wir also last not least auch aus diesem Grunde nicht in die Liste der Reifungserreger des Liptauer Käses aufnehmen, wogegen darin die verflüssigenden Kokken stehen bleiben.

Bei den übrigen im Käse gefundenen, wenn auch aus anderen Ursachen von der Liptauer Käsereifung ausgeschlossenen Mikroben, kennen wir heute noch nicht die Bedingungen, unter welchen ihre Enzyme tätig sind, daher können wir auch nicht sagen, ob diese letzteren zum Teil nach dem frühen Tode der lebenden Zellen nicht vielleicht doch irgendeinen, wenn auch nicht großen Anteil an den komplizierten Prozeß haben, den wir kurz als „Käsereifung“ zu bezeichnen pflegen. In vitro sind ja eigentlich nur wenige indifferente unter denselben. Um nur ein Beispiel zu erwähnen, so ist da der wohl aërobe Microc. candicans häufig der Fettspaltung fähig. Es ist denkbar, daß seine Enzyme einen Anteil an der Fettspaltung im Käse haben; späteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten, diese Fragen zu entscheiden.

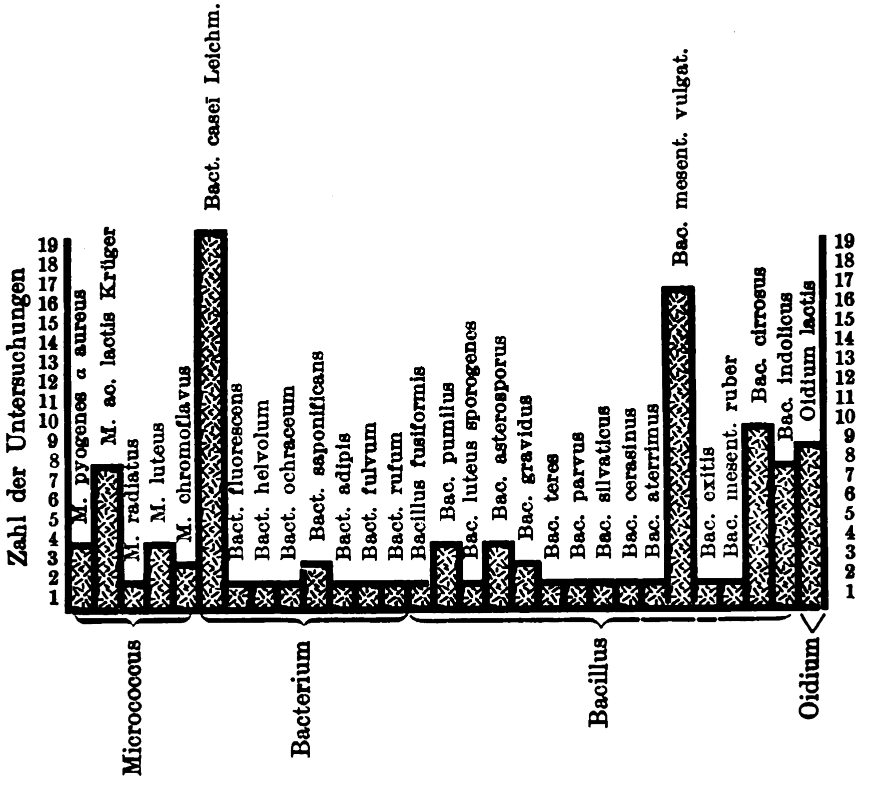
Fassen wir zusammen, was wir bisher gestrichen haben, und was bleibt!

Wegen ihres inkonstanten Vorkommens, nicht entsprechenden Verhältnissen und zum Teil wegen ihres indifferenten Verhaltens haben wir bis auf

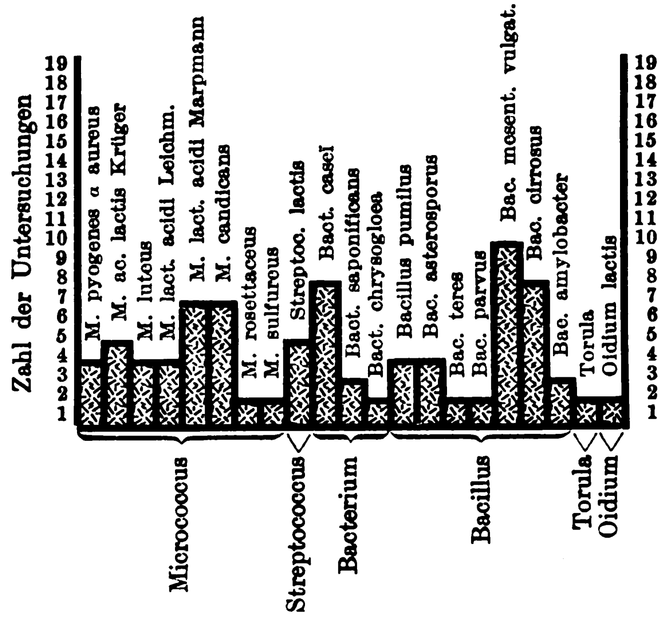
---

[1]) Lafars Handbuch. III. p. 127.

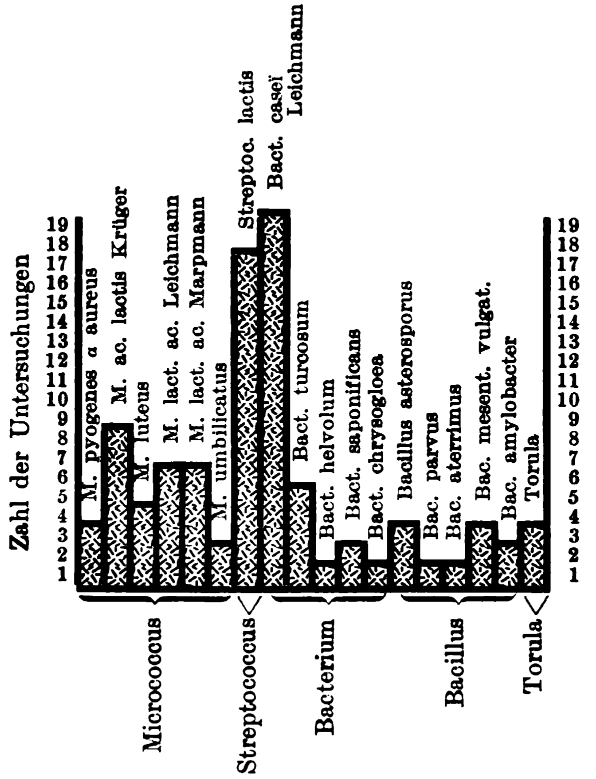
Die Häufigkeit der eiweißspaltenden Mikroben.



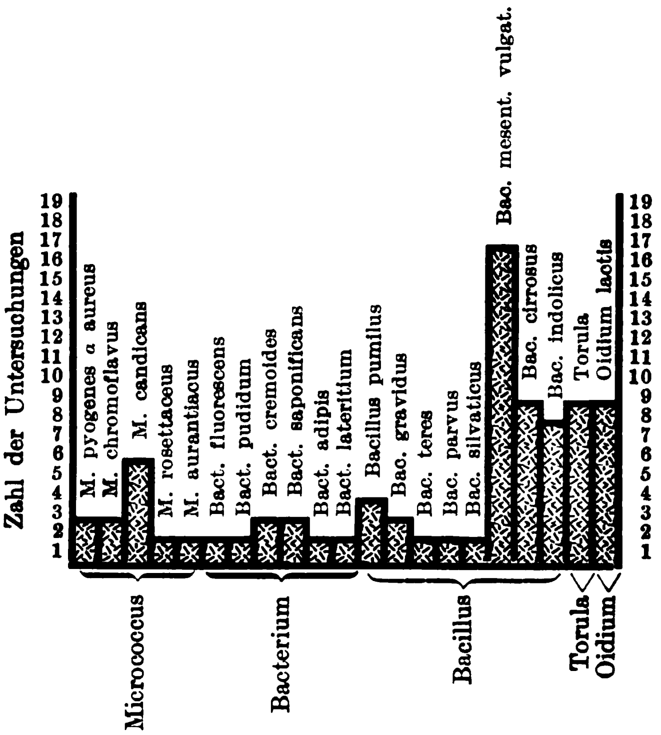
Die Häufigkeit der glyzerinspaltenden Mikroben.



Die Häufigkeit der milchzuckerspaltenden Mikroben.



Die Häufigkeit der fettspaltenden Mikroben.



Bact. casei sämtliche Bakterien und einen Teil der Kokken gestrichen. Die aëroben Bazillen strichen wir, weil ihnen und ihren Enzymen die Verhältnisse im Käse nicht passen, auch sind sie zum größten Teile nur inkonstant gefunden worden. Die Anaëroben schlossen wir aus, wegen ihrer Seltenheit, zum Teil weil sie nur Schaden im Liptauer stiften. Weiter stellten wir fest, daß Oidium lactis und Actinomyces odoriferus sich im Käse nicht vermehren können.

Es bleiben demnach stehen: Strept. lactis, Bact. caseï, die zum Typus des Microc. pyogenes aureus und M. lactis acidi Marpm. gehörigen Kokken und ein Teil der Hefen. All diese entsprechen allen Forderungen, die wir oben aufgestellt haben. Sie sind, wie wir gesehen haben, zahlreich und konstant zu finden, können im Käse gedeihen, da sie fakultativ anaërob sind (am wenigsten Microc. pyogenes aureus) und, soweit bekannt, ihre Enzyme bei den in den Käsen herrschenden Reaktionsverhältnissen nicht in ihrer Tätigkeit gehemmt werden.

Auch sind sie, wie wir der Tabelle VI entnehmen können, fähig, wenigstens zwei der wichtigsten Bestandteile der Käse anzugreifen.

Sicher ist demnach, daß wir diesen, auch für andere Käsesorten wichtigen Mikroben bei der Reifung des Liptauer Käses eine Hauptrolle zuschieben müssen; sicher ist aber auch, daß auch andere Faktoren dabei eine nicht zu unterschätzende Rolle spielen. So nehmen an dem Reifungsprozeß die Enzyme der Rindenflora einen wichtigen Anteil. Wir werden später sehen, daß z. B. die Lipase des auf der Rinde der Gomolyas gedeihenden Oidium lactis, die bei der Zubereitung in den Liptauer gelangt, dort weiter tätig ist. Auf demselben Wege können natürlich auch andere Enzyme in denselben gelangen. Die ohnehin schwierige Frage der Käsereifung wird auf diese Weise bezüglich der Liptauer Käse nur noch komplizierter, und es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, den Anteil der einzelnen Reifungsfaktoren zu bestimmen.

VIII. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Flora und dem Scharfwerden.

Der scharfe Geschmack mancher Käse kann nach Orla Jensens [1]) Untersuchungen auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Er entsteht erstens, wenn im Käse eine Valerian- oder Buttersäuregärung stattfindet. Dies ist jedoch bei den allermeisten Labkäsen nicht der Fall, wenigstens nicht unter normalen Verhältnissen. Die häufigste Ursache des Scharfwerdens ist vielmehr eine stärkere Fettspaltung, und die Schärfe ist dem Umfange derselben proportional. Die bei der Fettspaltung frei werdenden flüchtigen Fettsäuren, so besonders Butter-, Capron-, Capryl- und Caprinsäure, sind ja bekanntlich alle von scharfem Geschmack.

Bezüglich der Liptauer Käse bestätigte Fodor [2]) in unserer Versuchsstation, daß in den Käsen mit scharfem, stark kratzendem Geschmack das Fett in viel größerem Maßstabe gespalten wird (Säurezahl des Fettes über 120) als in den milden Qualitäten. Den kratzenden Geschmack schreibt Verf. der Caprinsäure zu. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß in einzelnen Käsen auch noch eine größere Menge nicht von Fettspaltung herrührender Fettsäuren — insbesondere Buttersäure — vorhanden sein kann.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1894. p. 292 u. 762.

[2]) Kisérl. Közlemények. XV. 1912. H. 3; Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel. Bd. 26. 1913. p. 225.

Fodor glaubt weiter, daß die Ursache des Scharfwerdens einer Mikrobeninfektion zuzuschreiben ist, da milder Käse, mit scharfem Käse gemischt, mit der Zeit äußerst scharf wird, für sich jedoch nicht.

Über die Ursachen der Fettspaltung im Käse wissen wir heute noch kaum etwas Sicheres. Jensen[1]) schreibt der Kohlensäure eine größere Rolle dabei zu, die ja, wie Clark[2]) neuerdings gezeigt hat, in großen Quantitäten von den Käsen zurückgehalten wird. Jensen hält es auch nicht für ausgeschlossen, das die Enzyme des in den ersten Tagen in großer Zahl im Käse gegenwärtigen Bac. fluorescens liquefaciens daran Anteil nehmen können. Hauptsächlich ist es nach letztgenanntem Forscher jedoch die Flora der Käserinde, der die Fettspaltung zuzuschreiben ist. Von hier aus dringt die Mikrolipase ganz langsam in das Käseinnere hinein. Daß Ammoniak — wie Duclaux annahm— nicht bei der Fettspaltung in Betracht kommt, wies Ejkman[3]) und Laxa[4]) nach. Von einer Oxydation des Fettes während der Käsereifung kann keine Rede sein, da sich die Jodzahl nur sehr wenig ändert. Löhnis[5]) ist der Ansicht, daß auch die anaërobe Fettspaltung bei den Hartkäsen eine gewisse Rolle spielen kann, bei der neben Mikroorganismen auch die Milchlipasen in Frage kommen.

Im Liptauer Käse, obwohl er ein aus mehreren Käsen gemahlener Streichkäse ist, finden wir Verhältnisse wie in Hartkäsen, sobald er einmal fest in die Tönnchen oder Fässer verstaut ist. Besonders ist dies der Fall in den großen Fässern, worin er für den Winter aufbewahrt wird. Der Unterschied ist bloß der, daß die feste Rinde der Hartkäse durch die tote Wand der Behälter ersetzt wird. Beim Reifen der Liptauer Käse kann also die Rolle der Rinde, die sie bei den Weich- und Hartkäsen spielt, nicht in Betracht kommen, und daher befriedigt uns auch die Erklärung nicht, daß die Fettspaltung von außen nach innen vorschreitet und ein Werk der Rindenflora ist.

Was mag also die Ursache sein, daß in einzelnen Tönnchen bei dem fest eingestampften Liptauer die Fettspaltung um vieles größer ist als in den anderen? Ist dies direkte Mikrobenarbeit? Betrachten wir die Tabelle VI, so sehen wir, daß sich die fettspaltenden Mikroben durchaus nicht bloß auf die scharfen Käse mit großer Fettspaltung beschränken, sondern gerade sogut in den scharfen wie in den milden zu finden sind, ja in ersteren fehlen können und in letzteren vorhanden sein können. Dies allein schließt schon aus, daß den isolierten, fettspaltenden Mikroben eine direkte Anteilnahme an der Fettspaltung im Liptauer Käse zuzuschreiben ist. Sie sind weiter, wie ja die Fettspalter im allgemeinen, fast alle aërob.

So ist z. B. kaum anzunehmen, daß Oidium lactis, bekanntlich ein reichlich Lipase erzeugender Pilz, sich vollständig von der Luft abgeschlossen in dem fest eingestampften Käse entwickeln kann. Daß wir Oidium lactis trotzdem in einem jeden Käse finden, ist dem Umstande zuzuschreiben, daß dasselbe während des Entzweischneidens, eventuell beim Schälen, von der Oberfläche des Gomolyakäses in das Käse-Innere verschleppt wird. Wir unterließen es, die Oidium-Kolonien auf den Platten zu zählen, da sie ja bei der Möglichkeit, daß mehrere Oidien aneinandergekettet oder Myceliumteile in den Nährboden zu liegen kommen, nur eine unsichere Zahl geben würden. Wie reich jedoch der Liptauer an Oidium lactis ist, kann man daraus ersehen, daß, wenn man den Käse mit der Platinnadel auch nur berührt und eine Kultur anlegt, eine reichliche Oidium-Vegetation erhält. Es gibt also kaum das kleinste Teilchen Käse, in dem Oidium lactis nicht enthalten wäre. Es wäre also denkbar, daß die Oidien in die Oidien und Mycelfäden während des Reifens langsam zerfallen (wir sahen ja, daß Oidium in den älteren Käsen verschwindet) und daß so eine Endolipase frei wird, der die starke Fettspaltung zuzuschreiben ist. Nach Laxas[1]) Untersuchungen besitzt jedoch das Oidium lactis keine Endolipase, das fettspaltende Enzym wird nur von der lebenden Zelle ausgeschieden. Dies und dann unser Befund, daß Oidium lactis sowohl in den scharfen wie auch in den milden Käsen in großer Menge zu finden ist, widerspricht der obigen Annahme, daß das dem Liptauer Käse einverleibte Oidium lactis die Ursache der starken Fettspaltung im Liptauer ist. Möglich ist es jedoch, daß sich das auf die angegebene Weise in den Liptauer geratene Oidium lactis trotz Luftabschlusses doch etwas vermehrt (im Agarstich kann man in den oberen Teilen des Stiches immer ein Wachstum bemerken) und vielleicht auch Lipase ausscheidet, die dann an der gewöhnlichen, in jedem Käse stattfindenden Fettspaltung Anteil nehmen würde. Ein Verbrennen der flüchtigen Fettsäuren, wie dies bei Oidium lactis unter günstigen Verhältnissen vorkommt, ist ja wohl in diesem Falle nicht in großem Maßstabe zu erwarten.

---

[1]) l. c.

[2]) U. Stat. Dep. of Agric. Bull. 151. p. 192.

[3]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 29. 1901. p. 848; zit. nach Löhnis, Handbuch.

[4]) Arch. f. Hyg. 1902. p. 144; zit. nach Löhnis.

[5]) Handbuch d. landw. Bakt. 1910. p. 381.

Wie wir bereits bemerkten, erscheint das Oidium lactis sehr schnell auf der Oberfläche der Käse, wenn dem Fäßchen ein Teil des Käses bereits entnommen oder infolge von Eintrocknen der Käse nicht mehr vollständig von der Luft abgeschlossen ist. Dies ist der Fall in beim Händler und im Haushalt aufbewahrten Käsen. Bei unseren Käsen war dies ausgeschlossen, da die Fäßchen, wie mitgeteilt, von außen mit Pech überzogen waren und die Oberfläche unterhalb des übergreifenden Deckels mit Paraffin übergossen war. Die Möglichkeit also, daß die Oidium-Lipase von der Oberfläche nach innen diffundieren konnte, war also ausgeschlossen. Die Entwicklung von Oidium auf den in den Käsereien für den Winter in Fässern eingeschlagenen Liptauer Käsen ist ebenfalls nicht möglich, da sowohl auf den Boden der Fässer, wie auch auf die Oberfläche eine dichte Salzschicht gelegt wird, die dies verhindert.

Oidium lactis bzw. dessen Enzym könnte auch noch auf eine andere Weise die Fettspaltung bewerkstelligen; bevor wir uns jedoch damit befassen, wollen wir zuerst den anderen fettspaltenden Mikroben, besonders den Hefen und anaëroben Bazillen vom Standpunkte des Scharfwerdens näher treten.

Bei unseren Untersuchungen fanden wir auch fettspaltende Sproßpilze im Liptauer Käse, solche züchteten wir auch aus dem Naturlab der Käsereien, in welchen sie häufig in großer Anzahl zu finden sind. In gewissen Fällen kann also mit dem Lab eine große Menge fettspaltender Sproßpilze in den Käse gelangen, und da dieselben meist auch unter fakultativ anaëroben Verhältnissen (im Stichbande der Gelatine oder Agarkulturen) gut gedeihen, ist sogar ihre Vermehrung im Käse eine Zeitlang nicht ausgeschlossen. Auch der sauere Nährboden, den sie im Käse finden, hindert sie, als säureliebende Mikroben, nicht daran. Es wäre also denkbar, falls wir im Käse fettspaltende

---

[1]) Zit. bei Kruse, Mikrobiologie. p. 435.

Sproßpilze finden, daß diese direkt oder indirekt durch ihre Enzyme an der Fettspaltung Anteil nehmen. Waren solche Fettspalter schon im verwendeten Labe vorhanden, so kann man weiter annehmen, daß bereits mit denselben fertige Enzyme in den Käse gelangen, falls die Säure sie nicht schädigt.

Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, daß die fettspaltenden Sproßpilze aus Käsen mit starker Fettspaltung fehlen, in solchen mit geringer aber wieder vorhanden sein können. Sie können daher den Hauptanteil beim Scharfwerden des Liptauer Käses nicht bilden; worauf unsere folgenden Infektionsversuche auch hinweisen.

Wir entfernten bei einen Gomolyakäse dick die Rinde und teilten das Käse-Innere in zwei Hälften. Die eine wurde mit fettspaltenden Sproßpilzen (fünf verschiedene und gesondert gezüchtete Stämme in Peptonmolkenkulturen) gemischt, die andere zur Kontrolle rein zu Liptauer verarbeitet und beide wurden gesondert in wohlverschlossene Gläser getan (bezüglich der Technik siehe p. 541).

Die Ergebnisse des Versuches sind aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich:

			Säurezahl des Käsefettes	
1913 29. VIII.	Käseinneres (Rinde dick entfernt)	frisch	3,1	Konsistenz, Geschmack normal; Farbe gelbweiß
27. X.	zu Liptauer verarbeitet	nach 2 Monaten	8,5	Etwas lockere Konsistenz, H_2S-Geruch, gelbweiß
29. VIII.	Käseinneres, wie oben	frisch	2,9	Konsistenz normal, Hefegeschmack und Geruch
27. X.	+ Sproßpilze (auf 1,3 kg Käse 100 ccm Kultur)	nach 2 Monaten	9,2	Weich, griesig, Hefe und H_2S-Geruch

Wir sehen, daß der unter der Einwirkung mit fettspaltenden Sproßpilzen bereitete Käse während zwei Monaten nicht scharf wurde und auch die Säurezahl nur unbedeutend gestiegen ist. Es ist überraschend, daß die Einwirkung von fettspaltenden Sproßpilzen keine kräftigere Fettspaltung der Käse hervorgerufen hat und liefert einen neuen Beweis, daß die Mikroben nur unter gewissen Verhältnissen imstande sind, ihre Fähigkeiten zu entwickeln und daß man vorsichtig sein muß, wenn man einem aus einem Substrat gezüchteten Mikroben eine Bedeutung zuschreiben will.

Gehen wir nun zu den aëroben Bakterien und Bazillen über. Aus der Tabelle VI ist ersichtlich, daß auch zwischen den aëroben Bakterien und den Bazillen der untersuchten Käse viele Fettspalter zu finden sind. Käse No. III enthält z. B. auffallend viele Fettspalter, ist aber nicht scharf. Es ist also diesen eine Rolle bei der Fettspaltung im Käse noch weniger zuzugestehen, wie den eben erwähnten Sproßpilzen. Ihre Vermehrung als luftbedürftige Mikroben ist in den fest eingestampften Käsen wohl um so mehr ausgeschlossen, als ihnen wohl auch die Reaktion des Nährbodens nicht zusagen wird. Eine geringe Beteiligung an der normalen Fettspaltung mögen sie oder ihre Enzyme vielleicht manchmal mehr oder weniger haben, die Ursache der bis zum Scharfwerden führenden Fettspaltung sind sie jedoch nicht, denn wir sehen, daß sie in scharfen Käsen fehlen und in milden vorhanden sind. Auch ist, wie wir weiter sehen werden, das Vorkommen der einzelnen Arten bei den Untersuchungen desselben Käses nicht ein regelmäßiges, sondern eher ein Zufall. Andere hingegen, wie die aëroben Bazillen, sind wieder in allen Käsen, mögen sie scharf sein oder nicht, immer bei jeder Prüfung vorhanden.

Da das Lab oft mit Salzwasser, anstatt mit Molken, bereitet wird, und in diesem Falle sich in demselben unter anderen fettspaltende Bakterien vermehren können, wie z. B. B. fluorescens, B. putidum, B. enteritidis-Arten usw., wäre es möglich, daß bereits beim Laben fertige Lipase in die Milch gelangt. Welche Bedeutung ihr zukommt, läßt sich aber vorläufig nicht sagen.

Es wären nun nur noch die Anaëroben einer näheren Betrachtung zu unterwerfen, die ja in den fest in die Fässer eingestampften Käsen unter sehr günstigen Verhältnissen leben. Die Putrificus-Arten sind ja bekanntlich kräftige Fettspalter, die anaëroben Buttersäurebakterien wieder können bei manchen Käsesorten bei der normalen Reifung, bei anderen unter normalen Verhältnissen die Ursache des Scharfwerdens sein. Daß vielleicht eine Buttersäuregärung in manchen Fällen ausschließlich oder in anderen neben starker Fettspaltung als beteiligter Faktor die Ursache des Scharfwerdens sein kann, darauf wies Fodors erwähnter Befund bei einem Käse hin, in dem er eine große Menge nicht von Fettspaltung herrührender Fettsäuren fand. Dies bewog uns, der Frage von der bakteriologischen Seite aus näher zu treten, ob sich wohl in den scharfen Käsen ständig Anaëroben, besonders Buttersäurebakterien, vorfinden oder nicht; wir untersuchten infolgedessen noch sechs weitere Käse auf Anaëroben, von welchen vier einen sehr scharfen Geschmack hatten.

Über das Vorkommen von anaëroben Buttersäurebakterien und Putrificus-Arten in den sechs eingehend untersuchten Käsen orientiert folgende Zusammenstellung:

Käse No.	1	keine Anaëroben:	scharf geworden
	2	B. amylobacter und Putrificusart (1, 2. u. 3. Unters.)	„ „
	3	B. amylobacter (3. Unters.)	unverändert
	4	Putrificusart	scharf geworden
	5a	„	unverändert
	5b	„	„

Von sechs weiteren Käsen, die nur auf Anaëroben geprüft wurden, erhielten wir (No. I, II, III und Nov.) vier als sehr scharfe Winterkäse; No. IV entstammt einem Konservierungsversuche und hatte, ohne scharf zu werden, ½ Jahr im Keller der Anstalt gestanden; No. V ist ein Käse, der fünf Monate im Kühlhause bei + 2° gestanden hatte und von welchem ein gleichlange, bei Kellertemperatur aufbewahrter Teil gleichfalls mild geblieben war.

Wir impften neben den Burri-Röhrchen behufs Anreicherung auch immer Milchröhrchen und Eiweißwürfel nach Achalme (nach Wr. Burri verschlossen) mit 0,5 bzw. 1,0 g des pasteurisierten Käsematerials. Wie wir sehen, war dies nicht nötig, da die Burrische Methode sehr zuverlässig ist.

		Milch:	Eiweißwürfel:	Burri-Röbre:	Befund:
I.	Scharfer Käse*	unverändert	unverändert	aërobe Bazillen	negativ
II.	„ „ *	„	„	„ „	„
III.	„ „ *	„	„	„ „	„
IV.	nicht scharf	„	„	stachelige Kolonie	Putrificusart
V.	„ „	peptonisiert, stinkt	löst sich, stinkt	2 flockige Kolonien	„

	Milch:	Eiweißwürfel:	Burri-Röhre:	Befund:
Nov. scharfer Käse	geronnen, Buttersäure-Geruch	löst sich, stinkt	zerrissen, stinkt 2 verschied. Kolonien	Buttersäurebakterie (B. parabutyricus) und Putrificusart

Bei den mit * bezeichneten Käsen ergab eine zweite Untersuchung ebenfalls ein negatives Resultat.

Aus obigen zwei Zusammenstellungen geht hervor, daß Anaëroben im Liptauer sehr häufig vorkommen. In sieben von elf Käsen fanden sich solche vor. Im allgemeinen scheinen die Putrificus-Arten die häufigeren zu sein, zweimal waren sie in Gesellschaft von Buttersäurebakterien. Von den sieben scharfen Käsen enthielten bloß drei Putrificus-Arten, hingegen fanden sich solche in einem jeden der vier nicht scharfen Käse. Wir glauben daher, annehmen zu dürfen, daß den Putrificus-Arten keine Bedeutung beim Scharfwerden des Liptauers beizumessen ist.

Von den drei Buttersäurebakterien entstammen zwei scharfen Käsen, eine fand sich bei der dritten Untersuchung eines nicht scharf gewordenen. Von sieben scharfen Käsen enthielten also fünf keine Buttersäurebakterien, woraus sich folgern läßt, daß, obwohl es denkbar ist, dieselben ausschließlich oder mit einem anderen Faktor vergesellschaftet die Ursache des Scharfwerdens sein könnten, dies jedenfalls nur ein Ausnahmefall ist.

Ausschließlich könnten sie nämlich die Ursache dann sein, wenn sie in einem verhältnismäßig frühen Reifestadium den Milchzucker vergären würden oder später den milchsauren Kalk. Vergesellschaftet könnten sie mit den fettspaltenden Faktoren, der anderen, häufigeren Ursache des Scharfwerdens, sein. Die erwähnte Untersuchung eines Käses von Fodor spricht für diese letztere Möglichkeit. Der von uns bakteriologisch untersuchte Käse ist mit Nov. bezeichnet und enthielt, wie wir sahen, eine Buttersäurebakterie.

Wir dürfen hier aber auch nicht vergessen, daß die flüchtigen Fettsäuren auch von einer Eiweißspaltung herrühren könnten; weitere Untersuchungen werden berufen sein, hier Licht zu schaffen, woher der große Anteil an nicht von einer Fettspaltung herrührenden Fettsäuren in einzelnen Käsen stammt.

Daß es selbst nach kräftiger Impfung mit Buttersäurebakterien nicht leicht gelingt, scharfen Käse zu erhalten, beweist der folgende Versuch:

20 l Kuhmilch werden in 2 Hälften geteilt, die eine als Kontrolle zuerst zu Liptauer verarbeitet, nachher die andere vor der Käsebereitung mit einer Bac. amylobacter Kultur (10 ccm in Peptonmolken) versetzt. Die Käse zeigen gleiches, nicht auffallendes Verhalten. Nach 3½ Monaten sind beide gleich säuerlich, quargartig, trocken und zäh. Die Destillationszahl des Amylobacter-Käse ist nur etwas höher (20,0) als die der Kontrolle (15), keiner der Käse ist scharf oder kratzend so, so daß die nähere Untersuchung unterbleiben konnte. Offenbar haben kräftige Milchsäurebakterien die Buttersäurebakterien unterdrückt.

Jedenfalls geht aus dem vorhergehenden mit Gewißheit hervor, daß die Anaëroben mit dem Scharfwerden des Liptauers, falls sie zu den Putrificus-Arten gehören, gar nichts, sind sie Buttersäurebakterien, nur selten zu tun haben.

Fassen wir das im vorstehenden Kapitel Gesagte zusammen, so zeigt sich, daß ein Zusammenhang zwischen dem Scharfwerden des Liptauers und der

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Fettspalter, resp. der Flora des Käses nicht besteht. Die Ursachen des Scharfwerdens müssen wir also anderwärts suchen.

IX. Geschmacks- und Konsistenzänderungen, Destillationszahl, Säurezahl des Fettes in den untersuchten Käsen.

Wir nennen einen Käse reif, wenn derselbe den vom Konsummenten verlangten Geschmack und die gewünschte Konsistenz erreicht hat. Dies ist beim Liptauer bald der Fall; er wird viel schneller reif als andere Käsesorten. Dementsprechend bleiben die chemischen Veränderungen, mit welchen Geschmack und Konsistenz ja innig verknüpft sind, im „reifen“ Liptauer um vieles weiter zurück, als z. B. in einem reifen Emmentaler oder Romadour.

Der „Gomolya“käse ist, die Reife im obigen Sinne genommen, also selbst kurz vor der Aufarbeitung zu Liptauer noch ganz unreif, zäh, sauer, und wir vermissen beim Kosten auch das Salz. Wird derselbe gemahlen, innig gemischt mit Salz und hat sich letzteres durch Diffusion einmal gleichmäßig im Käse verteilt, was 1—2 Tage dauert, so ist er schon fertig für den Konsum, also reif. Durch das Mahlen wird die Konsistenz, durch das Salz der Geschmack vorteilhaft geändert, und der Liptauer hat jetzt seinen angenehmen, milden, charakteristischen Geschmack erhalten und ist sehr gut streichbar.

Durch physikalische Änderungen infolge der technischen Maßnahmen wird also aus dem unreifen ein reifer Käse. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß Hand in Hand mit den physikalischen auch chemische Änderungen im Käse einhergehen, wie folgende Überlegung zeigt:

Beim Mahlen des Gomolya werden die Enzyme der Rindenteile mit denen der Mitte gleichmäßig im Käse verteilt, was, wie wir noch sehen werden, von großer Bedeutung ist.

Infolge des Salzens können gewisse Eiweißkörper in Lösung gehen, falls sich solche — wir haben vor der Hand den Nachweis nicht versucht — im Liptauer auch finden sollten, wie sie von Slyke und Hart[1]) beim Cheddarkäse gefunden worden sind. Das Alter des Liptauers zurzeit des Knetens würde für diese Möglichkeit gerade passen.

Gelangt der Käse nun in Tönnchen gestampft, oder, wie neuerdings, in Kartons zu den Delikatessenhändlern und Konsumenten, so ist, da er früher verzehrt wird, als sich solche einstellen könnten, meist nicht genug Zeit da für eine stärkere Zunahme chemischer Prozesse, obwohl, wie wir sehen werden, in manchen Käsen die Fettspaltung infolge der besonderen Bereitungsweise des Liptauers in kurzer Zeit schnell und weit vorwärtsschreiten kann. Sollte der Liptauer jedoch längere Zeit liegen, wie dies z. B. immer der Fall ist bei den in Fässern für den Winter eingeschlagenen, im Keller lagernden Käsen, die auch 8—10 Monate so verbleiben, so schreitet der Reifungsprozeß (richtiger ist dies schon ein Überreifen) weiter vor. Wir können dann neben dem Fortschreiten der Eiweiß- und Fettspaltung auch physikalische Änderungen an den Käsen bemerken. Der Käse verliert seine Streichbarkeit, wird bröselig oder klebrig, kleisterartig. Mit den chemischen Änderungen im Zusammenhange ändert sich natürlich auch der Geschmack, der Geruch und die Farbe des lange gelagerten Liptauers.

Bei solchen für den Winter aufbewahrten Käsen erreicht dann freilich die Eiweißspaltung eine „Tiefe“ und einen „Umfang“ wie z. B. beim Emmentaler, und die Fettspaltung ist (jedoch nicht bei allen Käsen) viel weiter vorwärts geschritten, als dies bei den Roquefort oder Gorgonsola der Fall ist, die nach bisherigen Untersuchungen unter den hierauf geprüften Käsen die stärkste Fettspaltung hatten. Bezüglich der 6 untersuchten Käse begnügten wir uns neben der Kontrolle der Konsistenz und der Geschmacksprüfung mit der einmaligen Bestimmung der Säurezahl, des Käsefettes und der Destillationszahl am Schlusse der bakteriologischen Untersuchungen. Es entsprach dies unserem Zwecke, aber es hätte auch die nach unserer Methode konservierte Quantität nicht für mehrere Untersuchungen gereicht. Das Gleiche gilt betreffs der Verfolgung der Eiweißspaltung. Um jedoch ein Bild von dem Stande des Käsereifungsprozesses im Liptauer zu geben, teilen wir folgende, gelegentlich anderer Untersuchungen erhaltene Zahlen mit:

---

[1]) New York Agric. Dep. Sta. Bull. No. 261. 1905.

	2 Wochen alt	Derselbe Käse 6 Monate alt
	in % des Gesamtstickstoffes	
Wasserlöslicher Stickstoff	29,23	35,03
Zersetzungsstickstoff	9,79	18,81
Ammoniakstickstoff	1,09	3,6
	in % des wasserlöslichen Stickstoffes	
Zersetzungsstickstoff	33,33	52,84
Ammoniakstickstoff	3,75	10,22
Säurezahl des Fettes	21,5	122,00

Wir konnten die Verfolgung der Proteolyse in den bakteriologisch untersuchten 6 Käsen aber auch deshalb vermeiden, da uns in erster Linie der Zusammenhang zwischen Flora und Scharfwerden interessiert hat. Fodor's1) Untersuchungen aber zeigten, daß zwischen Scharfwerden und Proteolyse kein solcher besteht. Wir erhalten nach F. nämlich, betreffend die Eiweißspaltung, bei den Untersuchungen ungefähr gleichaltriger, scharfer und nicht scharfer Käse ganz ähnliche Zahlen wie die obigen.

Betrachten wir nun an der Hand der folgenden Tabelle VII die Änderungen in den 6 untersuchten Käsen, so sehen wir, daß bezüglich der Konsistenz die Käse III und IV ihre gute Schmierbarkeit die ganze Zeit hindurch, 8—9 Monate, bewahrt haben, sie wurden jedoch etwas klebriger. Die Käse I, II und IV hingegen, in welchen, wie wir sehen, auch eine größere Fettspaltung stattgefunden hat, verlieren mit der Zeit diese Eigenschaft, werden trockener, zerfallen und zerbröckeln mit der Zeit. Dies ist bereits nach 2 Monaten der Fall, und schon deutlich bei 4—5 Monate alten Käsen bemerkbar. Von Fakrikanten erhielten wir scharfen Käse von ganz ähnlichem Verhalten. Diese Änderung der Konsistenz beruht nicht auf dem Wasserverlust, denn die Tönnchen waren ja mit Pech überzogen. Etwas Wasser mag in das Holz derselben wohl eindringen, aber soviel verloren gewiß auch die streichbar gebliebenen Käse.

Bezüglich des Geschmackes und Geruches erhalten wir ebenfalls die obigen zwei Gruppen. Die Käse No. III und V sind nach 8—9 Monaten noch kaum etwas scharf, wie dies ja auch die Säurezahl ihres Fettes zeigt. Der Geschmack und Geruch ist etwas dumpfig und muffig. Schon ganz jung sind die später sehr scharf werdenden Käse I, II, IV etwas schärfer wie die anderen. Im Alter von 1 Monat waren sie bereits scharf und kratzend und erreichten nach 8 Monaten eine 3,5 bis 4 mal so große Säurezahl wie die vorherigen. Der scharfe Geschmack ist oft mit einem eigentümlichen Beigeschmack vergesellschaftet, der Geruch wird „stark".

---

1) Kisérl. Közlemények. 1912. l. c.

Tabelle VII.
Konsistenz, Geschmacks-, Geruchs- und sonstige Änderungen der untersuchten Liptauerkäse.

No.	Tag der Ankunft	Herkunft	Tage alt bei den 4 Prüfungen	Konsistenz	Geschmack	Geruch	Farbe	Säure-¹) zahl des Fettes	D. Z.	Anmerkung
1	1912 30./V.	Rozsahegy	6	normal, gut schmierbar	etwas scharf	normal	gelblichweiß	—		
			29	normal, gut schmierbar	scharf, pikant	„	„	—		
			64	trocken, lose	sehr scharf, etwas kratzend	„	„	—		
			355	sehr lose, zerbröselt	sehr scharf und kratzend sonst rein	stark	„	90,4 (?)	211,80	
2	19./VI.	Zólyom	6	normal	gut, charakteristisch	normal	gelblichweiß	—	—	
			30	etwas weich	schlecht und scharf kratzend	stark, schlecht	gelblich	—	—	
			50	wird lose	scharf und kratzend	stark (nach Buttersäure) schlecht	„	—	—	
			133	lose	do. etwas bitter	putrid	„			
			334	trocken, lose	do. dumpf	„	schwach orange	169,7	227,15	
3	30./VII.	Dobó	6	gut schmierbar	mild, charakteristisch	normal	gelblichweiß			
			66	„	gut, nur wenig scharf	„	„			
			152	„	schlecht von Geschmack	dumpfig schlecht	„			
			284	„	schlecht, putrid nicht scharf	dumpfig schlecht	grünlicher Stich	42,0	127,9	

---

¹) Vgl. Orla Jensen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 169.

Tab. VII (Fortsetzung).

No.	Tag der An- kunft	Herkunft	Tage alt bei den 4 Prü- fungen	Konsistenz	Geschmack	Geruch	Farbe	Säure-[1]) zahl des Fettes	D. Z.	Anmer- kung
4	8./VIII.	Gyömberhavas	6	normal	gut, schwach scharf	normal	gelblichweiß			
			66	etwas lose	sehr scharf und kratzend	stark	„			
			152	trocken lose	„ Beigeschmack	stark, etwas dumpfig	schwach gelb			
			284	trocken, lose zerbröselt	s. scharf kratzt jedoch kein Beigeschmack	stark	blaß orange	145,3	180,60	
5a	30./IX.	Rozsahegy (schwach gesalzen)	6	weich, klebrig	mild, chark- teristisch	normal	gelbweiß			
			38	plastisch, klebrig	gut, etwas scharf	„	„			
			152	gut schmierbar	gut, etwas bitter	„	„			
			249	„	etwas scharf, muffig	muffig, etwas putrid	blaß gelbgrün- lich	40,6	103,20	
5b	30./IX.	do. (stark gesalzen)	6	weich, etwas klebrig	mild, charak- teristisch	normal	gelbweiß			
			38	plastisch	schwach, scharf gut	„	„			
			152	gut schmierbar	schwach scharf etwas bitter	„	„			
			249	do.	„ muffig	putrid muffig	blaß gelbgrün	36,6	88,30	

---

[1]) Vgl. Orla Jensen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 169.

Auch die Farbe der Käse erlitt eine Änderung. Wir hatten schon bei anderen Gelegenheiten bemerkt, daß die sehr scharfen Käse einen rötlichen Ton haben. Dies traf, wie wir aus der Tabelle sehen, auch bei 2 der aufbewahrten Käse zu, nur 1 blieb gelblich-weiß. Die übrigen, nicht scharfen Käse erhielten einen schwachen, grünlichen Stich; sie waren etwa von der gelblichgrünen Farbe der Molke.

Beachtenswert ist der Zusammenhang zwischen der Konsistenz und dem Scharfwerden. Die scharfen Käse sind lose, trocken und bröseln; die von Beginn an immerfort schmierbaren Käse aber ändern kaum ihren Geschmack. Welche Ursache mag dies haben?

Wir könnten einesteils denken, daß in den schmierbaren, klebrigen Käsen die die Fettspaltung verursachenden Lipase durch vorläufig nicht bekannte Ursachen inaktiviert oder paralysiert wurde; man könnte hier vor allen an einen größeren Säuregehalt denken. Jedoch schreitet in den scharfen Käsen die Fettspaltung noch bei einem sehr hohen Säuregehalt weiter fort, was dagegen sprechen würde.

Wir können uns jedoch ebensogut auch vorstellen, daß die losen Käse diese Konsistenz eben als Folge der Fettspaltung annehmen. Die Schmierbarkeit erhält nämlich der Liptauer einesteils vom Fett, andererseits vom Wasser, denn Fett allein genügt nicht, um die feinen Käseteilchen zusammenzuhalten. Zweifelsohne kommt jedoch dem Fette auch eine Bedeutung zu. Unter dem Mikroskop sehen wir ja auch die einzelnen Parakaseïnteilchen mit einer Fettschicht umgeben. Dieselbe ist bei fetten Käsen größer als bei mageren, und wir fühlen beim Kosten der ersteren, daß sie auf der Zunge „glatter“ sind, wie die letzteren, was wohl seine Ursache darin haben mag, daß die Käseteilchen bei fetten Käsen besser übereinander gleiten. Zersetzt sich nun das Fett in einem Käse, so fehlt der klebende Faktor mehr oder weniger, und so wird der Käse, obwohl er kein Wasser verlieren kann, eine lose Struktur erhalten und mehr oder weniger bröslig werden.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, zu entscheiden, ob die oben genannten Erklärungen richtig sind, oder ob etwa kolloidale Änderungen die genannten Konsistenzunterschiede verursachen.

Daß ein Zusammenhang zwischen der losen Konsistenz und dem Scharfwerden und vice-versa besteht, haben auch die Praktiker gefunden, die wir diesbezüglich gefragt haben.

X. Was ist die Ursache der starken Fettspaltung in manchen Liptauerkäsen?

Es käme nun noch die eingangs erwähnte Änderung der Enzym-Verteilungsverhältnisse im Liptauer Käse dem Gomolyakäse gegenüber in Betracht. Der Gedanke, daß vielleicht hierauf die Ursache der starken Fettspaltung einzelner Liptauer Käse beruht, liegt nahe, besonders, wenn wir bedenken, daß auf der Rinde immer fast ausschließlich das stark fettspaltende Oidium lactis zu finden ist und nebenbei gewiß auch andere Fettspalter und daß die Enzyme der Rindenflora in einem jeden Käse in eine gewisse Tiefe eindringen. Was speziell die Fettspaltung anbetrifft, so ist, wie wir gesehen haben, Orla Jensen[1]) auf Grund seiner Versuche der Ansicht, daß dieselben selbst bei den Hartkäsen von der Rinde von außen nach innen fortschreiten, daß also die Lipasen von der Rinde aus eindringen. Der genannte Verfasser machte auch gelegentlich bei Käseanalysen die Erfahrung, daß in den durchgemischten Käsemassen des sehr flachen Brie-käses die Fettspaltung außerordentlich schnell vorwärts schreiten kann.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 13. 1904. p. 292.

Nun wird aber die Rinde des Gomolyakäses entfernt, und man bereitet aus derselben den außerordentlich scharfen „Rindelkäse“ oder Korkovitza. Jedoch wird diese Arbeit nicht mit sehr großer Sorgfalt und Genauigkeit vorgenommen, so daß man damit rechnen kann, daß an den zur Liptauer Käseverarbeitung gelangenden Käseinnern mehr oder weniger Teile haften bleiben, die an Rindenenzymen, speziell an Lipasen, reich sind. Je nachdem also die äußeren Teile des Käses mehr oder weniger gut entfernt werden, werden mehr oder weniger Enzyme, darunter die Lipasen, der Rindenflora in den Käse hineingemischt und beteiligen sich dann an den Spaltungsprozessen, unter anderen also auch an der Fettspaltung.

Wir führten folgende Versuche aus, um die Richtigkeit dieser Annahme und speziell die Rolle des Oidium lactis festzustellen.

Versuch I. Ein gut mit Oidium lactis bewachsener Käse von der Größe eines Brotlaibes wird entzwei geschnitten. Unter der Rinde ist bereits eine ½—¾ cm breite Speckschicht. Die eine Hälfte wird samt der Rinde verarbeitet, die andere über die Speckschicht hinaus in einer Dicke von 2 cm geschält und aus dem so erhaltenen „Kern“ für sich mit 1 Proz. Salz Liptauer Käse bereitet. Die Proben machen 1,2 bzw. 1,3 kg aus, werden fest in Pulvergläser eingestampft, gut verschlossen und der Deckel überdies mit Paraffin überzogen.

Versuch II. Der Versuch gleicht dem vorigen, mit dem Unterschiede, daß bei einem anderen Käse die eine Käsehälfte ganz dünn geschält (nicht geschabt!) wird, also die „Speckschicht“ erhalten bleibt.

Als Kontrolle wird die andere Käsehälfte wieder dick geschält, sonst aber ganz ähnlich verarbeitet und aufbewahrt wie bei Versuch I.

Nach dem Gesagten ist es klar, daß der Versuch, den Einfluß der unmittelbar unter der Rinde folgenden Schicht auf die Käsemasse festzustellen bezweckte. Wir gingen hier von der Voraussetzung aus, daß, wenn von der Rinde aus Enzyme in den Käse diffundieren, die „Speckschicht“ wohl am reichlichsten solche enthalten muß. Andererseits war der Versuch berufen, auch darauf zu antworten, ob dies vom wirtschaftlichen Standpunkte vorzuziehende, dünne Schälen nicht einen Nachteil auf die Qualität des Liptauer ausübt.

Versuch III. In Versuch I operierten wir mit der reichen Mikroflora der Rinde und deren Enzyme, in Versuch II bloß mit den Enzymen der Rindenflora; Versuch III sollte nun speziell Aufklärung geben, wie sich die Enzyme des Hauptrepräsentanten der Rinderflora, des Oidium lactis, im Liptauer verhalten. Zu diesem Zwecke züchteten wir diesen Pilz auf in großen Petrischalen sterilisierten Gomolykäseschnitten von der Größe und Dicke einer kleinen Hand und setzten voraus, daß die Käseschnitte, da eine kräftige Entwicklung des Oidium lactis vorhanden war, mit den Enzymen, speziell der Lipase desselben sozusagen imprägniert seien. Waren die Käseschnitte so weit, so wurde ein Käse-Inneres (die Rinde dick entfernt) in 2 Hälften geteilt, die eine als Kontrolle für sich, die andere mit den früher fein gemahlenen Käseschnitten verarbeitet.

Die Ergebnisse der drei Versuche folgen in Tabelle VIII. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist durch die Versuche der Beweis geliefert, daß die starke

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle VIII.

Versuch	Datum	Verarbeitet zu Liptauerkäse	Zeitpunkt	Grad der Fettspaltung Säurezahl[1]	Anmerkungen
I. 1	1913 9./VII.	Käseinneres (Gomolya), Rinde dick entfernt	frisch	3,8	Konsistenz gut, Geschmack, Geruch normal mild säuerlich, gelblichweiß
	7./X.	derselbe	nach 3 Monaten	9,6	Konsistenz etwas locker, gut, Geschmack mild, riecht etwas nach H_2S, gelblichweiß
I. 2	9./VII.	Käseinneres und Rinde zusammen	frisch	7,9	Wie bei I. 1
	7./X.	derselbe	nach 3 Monaten	184,8	Konsistenz locker, Geschmack scharf und kratzend, Geruch stark Farbe orangegelb
II. 1	6./IX.	Käseinneres, Rinde dick entfernt	frisch	3,1	Wie bei I. 1
	27./X.	derselbe	nach 7 Wochen	9,9	Klebrige Konsistenz, Geschmack mild, etwas bitter, riecht etwas nach H_2S, gelbweiß
II. 2	6./IX.	Käseinneres, Rinde dünn entfernt	frisch	6,8	Wie bei I. 1
	27./X.	derselbe	nach 7 Wochen	124,7	Trockene, lockere Konsistenz, sehr scharf und kratzend, gelbweiß
III. 1	20./VII.	Käseinneres, Rinde dick entfernt	frisch	3,6	Weiche, etwas klebrige Konsistenz, sonst normal
	7./X.	derselbe	nach 2½ Mon.	14,7	Klebrig, Geschmack mild. Riecht etwas nach H_2S. Hell grünlichgelb
III. 2	20./VII.	Käseinneres, Rinde dick entfernt + auf sterilen Käsescheiben gezüchtetes Oidium lactis (etwa 13%)	frisch	17,7	Erhält einen eigentümlichen Beigeschmack und Geruch
	7./X.		nach 2½ Mon.	170,3	Trockene, lockere Konsistenz, sehr scharfer Geruch und Geschmack, kratzt im Rachen. Farbe blaß orangegelb

NB. Bei sämtlichen Käsen und auch den „Hefe-Käsen" (siehe p. 532) ist bereits vom 5.—6. Tage des Einfüllens in Gläser eine starke Gasbildung bemerkbar, die so stark ist, daß sogar der Verschluß gehoben wird und Käse herausquillt.

Fettspaltung und damit im Zusammenhang der scharfe, kratzende Geschmack in erster Linie den Enzymen des *Oidium lactis* zuzuschreiben ist. Wir sehen, daß die Säurezahl in dem mit den Enzymen des *Oidium lactis* bereiteten Liptauer gerade so ansteigt, wie in den Käsen, die samt der Rinde, bzw. mit der Speck-Enzym-Schicht bereitet wurden. Erreicht die Säurezahl in diesen oft fast 200, ist sie in den dick geschälten Kontrollen höchstens 14,7. *Die Enzyme des Oidium lactis sind also die* wichtigsten Faktoren bei der starken Fettspaltung, die in manchen Liptauer Käsen stattfindet, und zwar gelangen diese durch Einverleibung der Rindenteile in den Käse, infolge des nachlässigen Entfernens derselben. Für die Praxis der Liptauer Käsebereitung ergeben sich daraus wichtige Fingerzeige.

---

[1] Vgl. *Orla Jensen*, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. 1904.

Bezüglich der Konsistenz-, Farb- und Geschmacksveränderungen bestärken die Versuche unsere obenerwähnten, an den bakteriologisch untersuchten Käsen gemachten Beobachtungen. Was die Farbe betrifft, so erhält der Liptauer mit der Fettspaltung im Zusammenhang einen bloß orangegelben Ton, der mit der Zeit immer intensiver wird. Die Unterschiede waren auch am ausgekochten Fett zu sehen, indem das Fett der scharfen Käse immer bräunlich, das der Kontrollkäse hellgelb war.

Die Käse mit starker Fettspaltung verloren des weiteren meist ihre Schmierbarkeit, erhielten eine lockere, lose, die nicht scharfen Kontrollkäse aber bis auf I, 1 eine klebrige Konsistenz, was ebenfalls in Einklang mit dem auf p. 536 Gesagten steht. Immer scheint jedoch diese nicht an die starke Fettspaltung gebunden zu sein, wie denn auch der Kontrollkäse I, 1 mit der Zeit eine lockere Konsistenz erhielt, desgleichen die Hefekäse (p. 532).

Um zu sehen, ob mit lipolytischen Enzymen der Käserinde bzw. denen des Oidium lactis nicht vielleicht auch proteolytische Enzyme in den Liptauer gelangen und infolgedessen die Eiweißspaltung in den scharfwerdenden Käsen auch schneller verläuft, was ja denkbar ist, untersuchten wir die Käse der Versuche I, II und III zugleich auch auf die Menge des wasserlöslichen Stickstoffes, des Z. N. und A. N.[1]).

Die Ergebnisse folgen anbei.

				In % des Gesamtstickstoffes			In % des wasserlöslichen Stickstoffes	
		Alter:	Geschmack:	L. N.	Z. N.	A. N.	Z. N.	A. N.
Käse	I. 1	3 Monat	mild	24,92	11,48	3,55	46,06	14,24?
„	I. 2	3 „	scharf	44,32	19,32	6,19	43,39	13,96
„	II. 1	2 „	mild	61,65	12,09	3,80	19,61	6,16
„	II. 2	2 „	scharf	58,54	20,45	5,57	34,93	9,51
„	III. 1	2½ „	mild	37,33	14,45	3,14	38,84	8,43
„	III. 2	2½ „	scharf	45,54	23,14	5,48	52,13	12,04

NB. Wie wir der Tabelle VIII entnehmen, weisen die mit I. 1., II. 1., III. 1. bezeichneten, aus dick geschältem Käse bereiteten Liptauer keine große Fettspaltung auf, wohl aber die Käse I. 2., II. 2., III. 2., die mit Rinde, Speckschicht, bzw. Oidium bereitet wurden.

Leider konnten diese Untersuchungen nicht auch frisch nach dem Verarbeiten ausgeführt werden, um so auch den Anteil der Eiweißspaltungsprodukte kennen zu lernen, die durch die stärker gereifte Rinde, Speckschicht und die mit Oidium gereiften Käsescheiben den Liptauer Käsen einverleibt wurden. Die Differenzen zwischen den Eiweißspaltungsprodukten der scharfen und nicht scharfen Käse sind jedoch so groß, daß man mit großer Sicherheit annehmen kann, daß die größere Menge derselben in den Käsen mit starker Fettspaltung die Folge einer kräftigeren Proteolyse ist, und daß also mit der Rinde und Speckschicht neben den Lipasen auch proteolytische Enzyme in den Käse gelangen. Daß diese größtenteils von Oidium lactis herrühren, zeigt der mit diesen bereitete Käse III.

---

[1]) Vgl. **Orla Jensen** l. c.

Im Anschluß an die Eiweißspaltung in den Käsen mit starker Fettspaltung wollen wir kurz noch folgender Beobachtung Erwähnung tun:

Schon früher machten wir häufig die Beobachtung, daß die Käse mit starker Fettspaltung, die also reich an flüchtigen Fettsäuren sind, sich auch in offenen Behältern aufbewahrt, besser konservieren und nie schimmeln, was sonst beim Liptauer immer erfolgt. Dasselbe können wir auch aus den Angaben der VIII. Tabelle entnehmen, aus der wir sehen, daß in den milden Käsen die Eiweißspaltung eine andere Richtung nimmt als in den scharfen Käsen. In den Käsen mit starker Fettspaltung finden wir nämlich niemals H_2S-Bildung, das Bleiazetatpapier bleibt unverändert, immer aber in den milden Kontrollkäsen, bei welchen sich das Bleiazetatpapier beim Öffnen der Behälter fast momentan schwärzt. Wir glauben nicht irre zu gehen, wenn wir als die Quelle des H_2S nicht in den das Salz häufig verunreinigenden Sulfaten suchen, sondern darin ein Spaltungsprodukt des Parakaseïns sehen. Wir sehen ja, daß in den Liptauer Käsen häufig H_2S bidende Mikroben vorkommen. Besondere Aufmerksamkeit verdienen hier die Putrificus-Arten, die ja in einem großen Teile der Käse zu finden waren. In Käsen mit starker Fettspaltung wird also diese mit H_2S-Bildung einhergehende Eiweißspaltung hintangehalten.

Hierzu wollen wir bloß noch bemerken, daß die Konsumfähigkeit des Liptauer Käse durch die H_2S-Bildung keine Einbuße erleidet. Lassen wir nämlich den Liptauer nur einigemal durch die Knetwalzen gehen (Lüften!), so wird sich der Schwefelwasserstoff teilweise verflüchtigen und teilweise unter dem Einflusse des Luftsauerstoffes zu Schwefel und Wasser zerfallen. Vielleicht ist es dem letzteren Prozesse zuzuschreiben, daß die Oberfläche der milden Käse nach dem Öffnen der Gefäße recht bald einen intensiveren gelben Ton bekam.

Da wir als Hauptquelle der Putrificus-Arten das sehr häufig mit Salzwasser bereitete Lab ansehen, in welchem, wie wir bei unseren Labuntersuchungen fanden, Fäulniserreger recht gut gedeihen können, so glauben wir, daß sich durch Einführung einer richtigen Labbereitung diese H_2S-Bildung bei den milden Käsen überhaupt verhindern lassen wird. Die ganze H_2S-Frage wird uns noch beschäftigen.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen haben ergeben, daß im Liptauer Käse eine kunterbunte Musterkarte von verschiedenen Mikroorganismen zu finden ist. Die Ursache der bunten Flora ist nicht nur die immer recht unreine Schafmilch und das primitiv und oft fälschlich mit Salzwasser bereitete Naturlab, sondern hauptsächlich, daß während der Verarbeitung der Gomolyakäse zu Liptauer reichlich Gelegenheit zu einer nachträglichen Kontaktinfektion durch Rindenteile, Salz, Salzwasser, Knetwalzen, Luft usw. gegeben ist. Die Vertreter dieser akzidentellen Flora des Liptauers verhalten sich äußerst inkonstant, sind immer Zufallsbefunde und verschwinden schnell aus dem Käse. Die Hauptflora bilden die Milchsäurebakterien, die bei einer jeden Untersuchung immer in großer Zahl auf den Platten gefunden werden, wenn ihre Zahl anderen Käsen gegenüber durch die akzidentelle Flora auch etwas herabgedrückt wird. Der Hauptvertreter der Milchsäurebakterien ist Bact. caseï; der Streptococcus lactis verschwindet leicht früh und auch die Mikrokokken sind nicht so häufig wie im Gomolyakäse, aus dem der Liptauer bereitet wird. Die quantitativen Untersuchungen haben ergeben, daß von der Zeit der Bereitung des Liptauers an keine Mikrobenvermehrung mehr stattfindet, sondern nur ein Keimtod, und zwar geht die Keimabnahme in der ersten Zeit äußerst rasch vor sich, um später zu verlangsamen. Am schnellsten verschwindet die akzidentelle Flora bald in folgender Reihenfolge: Die Sproßpilze und Oidium lactis, dann die Mikrokokken und Streptococcus lactis. Am längsten ist Bacterium caseï noch am Leben zu finden und natürlich auch die durch ihre Sporen alles Leben im Käse überdauernden Bazillen.

Die Erwägungen haben ergeben, daß an der Reifung des Liptauer Käses die akzidentelle Flora, sofern sie den Käsebestandteilen gegenüber nicht indifferent ist, kaum beteiligt sein kann, da die im Käse herrschenden Verhältnisse (Luftmangel, Reaktion) weder zu ihrem Gedeihen, noch zur Entfaltung einer Enzymtätigkeit geeignet sind und ihre Vertreter auch nur sehr inkonstant und sporadisch vorkommen. Soweit es sich um Anaëroben handelt z. B. Putrificus-Arten, so stiften sie nur Schaden an. Wir kamen demnach zu dem Resultate, daß außer dem Labe und den Milchsäurebakterien bloß vielleicht den Sproßpilzen eine Bedeutung für das „Reifen“ des Liptauer Käses beizumessen ist, daß aber bei der heute geübten Bereitungsweise desselben sich als ein wichtiger Reifungsfaktor die Enzyme (Proteasen und Lipasen) der Rindenflora (besonders Oidium lactis) daran beteiligen.

Was die in manchen Käsen stattfindende, äußerst schnelle, zum „Scharfwerden“ führende Fettspaltung betrifft, so haben teils die bakteriologischen, teils verschiedene Käsebereitungsversuche ergeben, daß diese weder durch die Tätigkeit fettspaltender Bakterien oder Sproßpilze, noch durch autolysierte Mycelteile bzw. Oidien des Oidium lactis im Käse hervorgerufen wird. Diese können nämlich in Käsen mit starker Fettspaltung fehlen, in immerfort milden aber stark vertreten oder aber in scharfen wie milden gleich vorhanden sein.

Hingegen ergab sich, daß die von dem auf den Gomolyakäsen immer reichlich gedeihende (es findet keine Rindenbehandlung statt) Oidium lactis ausgeschiedene Lipase unter die äußerste Rinde des Gomolyakäses eindringt und daß die starke Fettspaltung einzelner Käse durch die bisher unvollständig und oberflächlich geübte Entfernung der an Lipasen reichen äußeren Teilen des Käses bedingt wird.

Nach den vorliegenden Untersuchungen scheint es, wenn überhaupt möglich, nur eine seltene Ausnahme zu sein, wenn dem „Scharfwerden“ des Liptauer Käses nicht eine Fettspaltung, sondern eine Buttersäuregärung zugrunde liegt.

Beobachtet wurde weiter, daß in allen Käsen ein mit mehr oder weniger heftiger Gasbildung einhergehender Prozeß stattfindet. Dann, daß die Käse mit starker Fettspaltung mit der Zeit eine trockene, lose, bröcklige Konsistenz und eine blaßorangene Farbe erhalten und daß sie durch die große Menge von flüchtigen Fettsäuren immer daran gehindert werden, selbst in offenen Gefäßen zu schimmeln. Die nicht scharfen Käse bleiben mehr oder weniger unverändert oder werden mit der Zeit klebrig und beginnen, wenn nicht luftdicht verschlossen, leicht zu schimmeln, wobei sich meist auch ein Schwefelwasserstoffgeruch bemerkbar macht, der jedoch durch einmaliges Kneten schnell und leicht verschwindet. Diese Beobachtungen zu erklären, gingen wir vorläufig nur auf theoretische Erwägungen ein.

Für die Praxis der Liptauer Käsebereitung ergibt sich demnach: Der Liptauer muß nicht unbedingt scharf werden, da die Ursache desselben nicht gewisse Mikroben sind, deren Eindringen der Käsefabrikant nicht verhindern kann, sondern, daß die scharfen Käse die Folge einer fehlerhaften Technik sind. Bei entsprechender Bereitung, d. h. durch sorgfältigere Entfernung der äußeren, an lipolytischen Enzymen reichen Teilen, als dies bisher der Fall ist, kann das Scharfwerden des Liptauer Käses verhindert werden.

Nachdruck verboten.

Über die Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes auf den Boden und die ihn bewohnenden Pflanzen.

[Aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut der Universität Göttingen.]

Von **Alfred Koch.**

Mit 4 Tafeln.

Vor einiger Zeit äußerte Herr Geheimrat Wallach in Göttingen mir gegenüber die Vermutung, daß das auffallend geringe Pflanzenwachstum in Nadelwäldern vielleicht zum Teil auf die Giftwirkung der von den Nadelbäumen produzierten ätherischen Öle zurückzuführen wäre. Gelegenheit, dieser Anregung nachzugehen, bot sich bald.

Denn ungefähr um dieselbe Zeit forderte mich Herr Forstmeister Kautz in Sieber (Harz) auf, Untersuchungen darüber anzustellen, warum unter Buchen der Boden in gutem, tätigem Zustande bleibt, so daß die Sämlinge der Waldbäume dort gut gedeihen und die natürliche Verjüngung des Waldes glatt von statten geht, während im Nadelwald die Zersetzung der Nadelstreu einen Boden erzeugt, in dem nur wenige Pflanzen wachsen und sogar die Sämlinge der Fichte selbst gewöhnlich bald wieder durch Vertrocknen

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

zugrunde gehen. Diese Frage ist von großer volkswirtschaftlicher Bedeutung. Denn immer mehr ist man bestrebt, frei werdende Flächen bei uns mit Nadelhölzern aufzuforsten. So stieg in Deutschland von 1890—1910 die Waldfläche um 100 000 ha, wobei aber die Laubholzfläche um ebensoviel, also um 100 000 ha abnahm, und dementsprechend die Nadelhölzer um 200 000 ha zunahmen. Die Nadelhölzer haben also nicht nur den ganzen Zuwachs der Waldfläche mit Beschlag belegt, sondern auch noch eine ebensogroße Fläche den Laubhölzern entrissen.

Wenn also wirklich die Nadelhölzer den Boden verschlechtern, so muß man diesen Vorgang aufzuklären suchen. Nur so wird man entscheiden können, ob es angezeigt ist, den gesteigerten Nadelholzbau weiterzutreiben.

Als Mittel, um durch die günstigen Wirkungen der Buche die schädlichen der Nadelhölzer zu paralysieren, empfiehlt Forstmeister Kautz in Fichtenwäldern eingesprengte Buchen peinlich zu schonen und denselben Grundsatz verfolgt Forstmeister Wiebecke (Eberswalde) in den Kiefernwäldern der märkischen Dünensandböden, welche Vogel von Falckenstein auf seine Anregung hin chemisch studierte.

Auch Ramm beschreibt aus dem württembergischen Schwarzwald, daß es jetzt mehr und mehr unmöglich werde, die Schwarzwaldtannen in altberühmter Vollkommenheit zu züchten, welche früher als Holländer Stämme den Rhein herunter geflößt wurden. Er beschreibt, wie im Schwarzwald unter Buche die schädliche Ortsteinbildung viel weniger intensiv auftritt, wie unter Tannen, und die Buche mit ihren Wurzeln den Ortstein zu durchdringen und zu zersetzen vermag. So wird auch dort die Buche das Mittel, den durch Nadelholzkultur erkrankten Boden wieder gesund zu machen. Diese Andeutungen weisen schon darauf hin, wie verschiedenartig der Humus ist, der durch Zersetzung des Laubes und der Nadeln und der sonstigen, von den Waldbäumen abfallenden Reste auf dem Waldboden entsteht. Vor allem sind die so entstehenden Humusarten sehr verschieden geeignet zur Pflanzenernährung. Daß der entstehende Humus verschieden gut ist, je nach der Baumart, aus deren Blättern er entsteht, ist den Forstleuten längst bekannt. Die Bäume wirken in verschiedenem Grade bodenverbessernd durch Erzeugung eines guten Humus und vielleicht auch noch in anderer Weise. Am besten soll Haselnuß wirken, dann in absteigender Reihe Buche, Ahorn, Erle, Ulme, Linde. Schlecht wirken Akazie, Esche und Sorbus. Von den Nadelhölzern sollen am besten wirken die Weymouthskiefer, dann die anderen Kiefern, solange sie jung sind, dann folgen in absteigender Reihe Weißtanne und Fichte.

Ein glänzendes Beispiel, wie günstig geeignete Bäume die Waldkultur vorbereiten, sind die Aufforstungen auf den ehedem öden Kalkbergen des Hainbergs bei Göttingen, wo Weißerle und Pinus maritima als Bodenverbesserer mit vorzüglichem Erfolg benutzt wurden.

Je nach Bodenverhältnissen und Klima kann aber auch bei sonst in dieser Hinsicht günstig wirkenden Bäumen die Zersetzung der abfallenden Blätter usw. sich verschlechtern. Als eine solche krankhafte Humusbildung ist wohl der forstlich gefürchtete Trockentorf anzusehen, dessen Vorhandensein durch bestimmte auf ihm wachsende Pflanzen, wie Heidelbeeren usw. angezeigt wird. Diese Pflanzen sind wohl auch aktiv bei der Erzeugung des Trockentorfs beteiligt, oder sie finden nur auf ihm die günstigsten Bedingungen des Wachstums und verraten so seine Anwesenheit.

Selbst die sonst so ausgezeichnet bodenverbessernde Buche kann solche krankhaften Humusbildungen erzeugen, auf denen selbst die Buche nicht mehr wächst. So erzählt P. E. Müller von den Trockentorf erzeugenden Buchen im mittleren Jütland, die deswegen unaufhaltsam der den Buchenwald verdrängenden Heide zum Opfer fallen. Vielleicht hat dort die auch sonst im Forstbetrieb unheilvolle Reinkultur einer Baumart schädlich gewirkt. Denn früher wuchsen in den betreffenden Gegenden so vorzügliche Eichen, daß Christian IV. und auch die Schweden um 1645 von dort ihr Schiffsbauholz bezogen. Dann verdrängte die Buche die Eiche, und jetzt hat auch sie dort abgewirtschaftet und unterliegt der Heide.

Wenn, wie eingangs erwähnt, unter Buchen die Sämlinge der Waldbäume sich gut entwickeln, in Nadelwäldern nicht, in letzteren überhaupt eine auffallende Pflanzenarmut herrscht, so sind dafür gewiß eine ganze Reihe von Gründen verantwortlich zu machen. Erstens der beträchtliche Lichtmangel unter stark schattenden Nadelbäumen, wodurch vielen Pflanzen die Kohlensäureassimilation, vielen Samen auch die Keimung unmöglich gemacht wird. In Wäldern von Kiefern und ähnlichen Bäumen, die viel Licht einfallen lassen und wenig Schatten erzeugen, fällt dieser Grund einer Wachstumsbehinderung dagegen fort. Dann die günstigeren Wasserverhältnisse im Buchenwaldboden, auf die Kautz das Hauptgewicht zu legen geneigt ist. Damit im Zusammenhange steht auch der von Fricke klar bewiesene Einfluß der Wurzelkonkurrenz. Er zeigte, daß ein Durchschneiden der flach streichenden Wurzeln der älteren Stämme eines Bestandes durch ringförmige 25—30 cm tiefe Gräben genügt, um innerhalb des Grabenringes vorhandene junge Föhren viel üppiger wachsen zu lassen: „Schon im ersten Sommer wurden die neuen Nadeln der umgrabenen Föhren (in 70—100-jährigen Baumorten) doppelt so lang wie sonst, die Höhentriebe wurden länger usw.“ „Auf den umgrabenen Plätzen erschienen plötzlich **Campanula**, **Fragaria**, **Hieracium**, **Rumex**, **Veronica**, **Hypericum**, **Epilobium**, **Pirola**, **Centaurea**, **Geranium**, **Viola**, **Potentilla** usw., Birken und Vogelbeeren, während sie im angrenzenden Bestande fehlten. Die auf jenen umgrabenen Stellen schon vorher vorhandenen Gräser (**Anthoxanthum**, **Aira**, **Agrostis**, **Nardus**, **Luzula** usw.) und Beerkräuter entwickelten sich üppig, so daß saftig grüne Inseln entstanden. Ebensolche mit Gräben umgebene Plätze (Boden 4. Klasse) in 100-jährigem Föhrenbestande wurden mit Föhren- und Fichtensamen, Eicheln (**Quercus rubra**) und Bucheln belegt. Die Sämlinge entwickelten sich innerhalb des Grabens auffallend besser.“

Fricke ist der Ansicht, daß die Wurzelkonkurrenz hauptsächlich auf Austrocknung durch die flachstreichenden Wurzeln beruht, da die Feuchtigkeit innerhalb eines Grabenringes infolge Durchschneidung der Wurzeln bedeutend zunahm, wie die ausgeführten Bestimmungen zeigen.

Die erwähnte Anregung des Herrn Geheimrat Wallach gab mir nun Veranlassung, zu untersuchen, ob zu den aufgeführten Gründen des schlechteren Wachstums kleinerer Pflanzen im Nadelwalde als weiterer hinzukäme die Giftwirkung der von den Nadelbäumen produzierten ätherischen Öle, welche in den abfallenden Nadeln usw. enthalten, sich in der Luft und dem Boden des Nadelwaldes verbreiten könnten. Außer den ätherischen Ölen wurden auch noch andere eventuell giftig wirkende Stoffwechselprodukte der Nadelbäume, wie Gerbstoffe, Harze, Ameisensäure in den Kreis der Betrachtung gezogen. Für solche Giftwirkung spricht die bekannte Erfahrung, daß im Garten unter Nadelholzreisig, welches zum Bedecken von Rosen usw. im Winter benutzt wird, der Rasen zugrunde geht.

Es war nun erstens zu untersuchen, wie die genannten Stoffwechselprodukte auf die höheren Pflanzen selbst wirken, ob sie deren Wachstum im Nadelwalde direkt hemmen oder verhindern könnten. Zweitens aber war ihre Einwirkung auf die kleinen Pflanzen, die Bakterien und Pilze zu verfolgen, welche vorbereitend auf Wachstum und Ernährung der höheren Pflanzen wirken, indem sie die notwendigen Stoffumsetzungen und -wandlungen im Boden des Waldes und der diesen bedeckenden Laub- und Nadelstreu besorgen, durch welche die Pflanzennährstoffe in assimilationsfähige Form kommen. Mit letzterer Fragestellung nähern wir uns wieder den schon berührten Humusfragen. Denn die Möglichkeit ist nicht von der Hand zu weisen, daß der von der einen oder anderen Baumart gelieferte Humus deshalb weniger geeignet zur Pflanzenernährung ist, weil er giftige Stoffwechselprodukte seiner Mutterpflanze enthält.

Daß ätherische Öle giftig auf lebende Wesen wirken, zeigt eine reiche Erfahrung. So soll Terpentinöl auf der menschlichen Haut brennen und Rötung, auch Blasen und Eiterpusteln hervorrufen. Stark reizend wirkt auch das ätherische Öl von Juniperus Sabina auf den menschlichen Körper[1]).

Bezüglich der Tiere seien Beobachtungen von Stahl erwähnt, dem es im Verlaufe seiner Untersuchungen über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Tierfraß auffiel, daß in der Umbelliferenabteilung des Jenenser botanischen Gartens sich nie ein Spatz zeigte. Als er dann gewaltsam Spatzen mit den an ätherischen Ölen reichen Umbelliferenfrüchten fütterte, da sie dieselben auch in der Gefangenschaft freiwillig nicht annahmen, genügten 10 Früchte von Archangelica officinalis oder 15 Früchte von Foeniculum officinale oder 5 Früchte von Carum carvi, um je einen Spatz zu töten.

Die Wirkung ätherischer Öle auf Pflanzen hat schon DeCandolle 1832 studiert. Er ließ Terpentinöl und Bittermandelöl in Dampfform auf Blätter wirken und sah, daß braune Flecken entstanden und die Blätter allmählich abstarben. In direkter Berührung mit den Öltropfen trat bald der Tod ein. Ähnliche Versuche stellten Schübler mit Pfefferminzöl und Kampfer, Nobbe und Hänlein mit Lavendel- und Krauseminzöl an. Neuerdings beschäftigte sich Heller (1903) in seiner Dissertation mit dieser Frage und fand, daß besonders in Dampfform ätherische Öle sehr giftig auf Pflanzen wirken. Coupin machte Versuche mit Roggenkeimlingen und einer sehr großen Reihe ätherischer Öle, die in Dampfform sofort töten oder das Wachstum hemmen. Nur drei waren unschädlich.

Auch Bakterien werden durch ätherische Öle geschädigt, worauf die desinfizierende Wirkung des Terpentinöles auf Lunge und Harnwege beruht. Senföl hindert nach R. Koch in der Verdünnung 1 : 330000 merklich das Wachstum von Milzbrandbazillen und Terpentinöl wirkt in der Konzentration 1 : 75000 bereits ähnlich. Auch Benzylsenföl ist nach Beijerinck (siehe Czapek) sehr giftig. Cadéac und Meunier klassifizierten die ätherischen Öle nach ihrer Giftwirkung auf Typhus- und Rotzerreger. Der gewöhnlich in der bakteriologischen Technik als sehr kräftig bakterientötend wirkendes Agens verwendeten 1°/₀₀ Sublimatlösung kommt nach diesen

---

[1]) Meyer und Gottlieb, Pharmakologie. 2. Aufl.

Autoren chinesisches Zimtöl in der Wirkung etwa gleich. Es folgen die Öle von Origanum creticum, Thymus und Citrus, später erst Terpentinöl. Weit weniger giftig für die genannten Bakterien sind Kampfer und Pfefferminzöl. Kobert untersuchte die antiseptische Wirkung terpenfreier und terpenhaltiger ätherischer Öle in der Weise, daß er feststellte, welche Mengen der Öle die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Schwefel durch die Bakterien der rohen Milch verhindern. Dieselbe Versuchsanordnung benutzte auch Geinitz. Viele terpenhaltige und terpenfreie Öle besitzen dieselbe Wirkung wie Sellerie-, Pfefferminz-, Eucalyptus-, Rosmarin-, Bay-, Nelken-, Kassia- und Lavendelöl. Andere terpenfreie Öle wirken stärker als die entsprechenden terpenhaltigen, z. B. Bergamott- und Citronellöl. Die aus den Ölen isolierten Terpene besitzen zum Teil eine geringere antiseptische Kraft, andere, wie die aus Sellerie-, Lemongras-, Pomeranzen-, Zitronen-, Anis-, Lavendel- und Kassiaöl wirken ebenso stark wie die Öle, aus denen sie gewonnen wurden, weniger stark wirken die aus Dill-, Rosmarin-, Bay-, Nelken- und Citronellöl.

Eingehende Angaben über die Giftwirkung ätherischer Öle auf Pilze und Bakterien macht auch Bokorny, der von der Erfahrung ausgeht, daß manche Pflanzendekokte oft erst nach langer Zeit Entwicklung von Bakterien und Pilzen zeigen, weil sie ätherische Öle enthalten. Er prüft in dieser Richtung Nelken und Zimt, Vanille, Bittermandelöl, Römisch-Kümmelöl, Thymian, dann die ätherischen Öle, welche sich in Umbelliferen und Labiaten finden, dann diejenigen aus Lorbeer, Eucalyptus, Zitronen, Pfeffer, Paprika, Wachholder, Terpentin, Senföle, Knoblauchöl und einige andere.

Im großen und ganzen findet Bokorny, daß die Terpene häufig starke Gifte für Schimmelpilze, schwache für Fäulnisbakterien sind. Wenn Terpentinöl z. B. in der Verdünnung 1 : 50 000 antiseptisch wirkt, so wird es darin nur durch Sublimat und Höllenstein, die stärksten Mineralgifte, übertroffen. In einer anderen Arbeit beschäftigt sich Bokorny hauptsächlich mit der Giftwirkung des Hopfenöles und behandelt im Anschluß daran auch die von Kampferarten, Nelkenöl, Thymol, Zimtöl, Vanillin und Senföl.

Bouchardat empfiehlt ätherische Öle zur Niederhaltung der Bakterienentwicklung bei Enzymversuchen.

Riedlin kommt in seiner Dissertation zu folgenden Schlüssen:

Terpentinöl in 1 Proz. Emulsion wirkt kräftig behindernd auf Bakterienvegetationen. Nährgelatine mit Terpentinzusatz 1 : 200 ist für Spaltpilzentwicklung ungeeignet. Dagegen vermag 1 Proz. Terpentinemulsion Milzbrandsporen nicht zu töten. Terpentin in Substanz wirkt kräftig antiseptisch, dringt, auf 10 Proz. Gelatine aufgetragen, bis zu 15 mm in dieselbe und verhindert soweit jede Entwicklung. Lavendel-, Eucalyptus-, Rosmarinöl sind von den übrigen ätherischen Ölen die antiseptisch wirksamsten. Lavendel- und Rosmarinöl dringen bis zu 10, Eucalyptusöl bis zu 15 mm in 10 Proz. Gelatine und verhindern soweit jede Vegetation. Von den übrigen antiseptischen Ölen besitzt das Nelkenöl noch die größte antiseptische Kraft. Alle anderen, wie Thymian-, Fenchel-, Pfefferminz-, Anis-, Juniperusöl und Kampfer sind als Antiseptika von untergeordneter Bedeutung.

Wenn es hiernach aussichtsvoll erschien, die Wirkung ätherischer Öle auf die Waldpflanzen und die Waldbodenbakterien zu untersuchen, so lag dies weniger nahe für die anderen Stoffwechselprodukte der Waldbäume, die in den Kreis der Betrachtung gezogen werden sollten.

Und doch ist für Ameisensäure bekannt, daß sie sehr giftig auf Hefen, Kahmpilze und Bakterien wirkt, und man benutzt sie deshalb jetzt oft z. B. als Fruchtsaftkonservierungsmittel.

Gerbstoffe werden in größter Verbreitung in Pflanzen angetroffen, wo sie teils als Schutz gegen Tierfraß dienen, teils zur Konservierung der abgestorbenen Gewebe in Borke und Kernholz, welche als festigende und schützende Elemente der Pflanze noch von Nutzen sind und ohne Gerbstoffe bald der Verwesung unter dem Einfluß von Pilzen und Bakterien zum Opfer fallen würden.

Die fäulnishemmende, also bakterienfeindliche Wirkung der Gerbstoffe ist ja auch aus der Gerbereipraxis bekannt.

Gegen Tierfraß schützen Gerbstoffe die Pflanzenteile sehr wirksam, die so gefräßigen Schnecken z. B. verschmähen ihr Lieblingsfutter die Karotten, wenn man diese Nahrung vorher in Tanninlösung legt.

Auch dafür, daß Harze hemmend auf die Entwicklung niederer Organismen wirken, ließen sich Anhaltspunkte finden. So verwenden die Griechen seit den Zeiten des Altertums allgemein einen Zusatz von 2—15 Proz. Harz von Pinus halepensis zum Wein, um dieses Getränk vor Essigstich und dem Kahmigwerden zu schützen.

Nach freundlichen Mitteilungen des Herrn Dr. Rhoussopoulos von der Firma Hamburger & Cie. in Patras, wird das Harz vor der Gärung dem Most schon zugesetzt und nach der Gärung wird der Wein direkt von der Hefe verbraucht, also nicht abgezogen, hat also die ausgiebigste Gelegenheit, durch Entwicklung von Bakterien und Kahmpilzen krank zu werden. Gegen diese Gefahr soll der Harzzusatz schützen.

Darüber, wie man auf dieses Mittel gekommen ist, habe ich nichts Sicheres feststellen können. Vielleicht hat man nach einer im ägyptischen Museum in Kairo befindlichen Darstellung tönerne Weinkrüge innen mit Harz gedichtet[1]) und hat so zufällig beobachtet, daß der Wein sich in solchen Gefäßen besser hielt. Andererseits hat man Harz in Ägypten nach Reutter und Tschirch zur Verhinderung der Leichenfäulnis bei der Einbalsamierung der Mumien also auch als Bakterienentwicklung verhinderndes Agens verwandt. Schmidt glaubt freilich nicht, daß diese Harze konservierend auf die Leichen gewirkt hätten, sondern nur als Klebmittel für die Bandagen benutzt wären. Übrigens wird in Frankreich in der Spiritusbrennerei heute noch ein kleiner Harzzusatz (6 g pro Hektoliter) benutzt, um die Bakterienentwicklung zu hemmen. Freilich meint Levy sonderbarer Weise, das Harz wirke nicht in dieser Weise, sondern beschwere die Bakterienzellen und reiße sie nieder.

Unsere eigenen Untersuchungen über Buchen- und Fichtenwaldböden sollten zunächst prüfen, ob in diesen Böden wirklich Pflanzen verschieden gut wachsen. Das Bodenmaterial lieferte Herr Forstmeister Kautz[2]) aus der königlichen Oberförsterei Sieber (Harz). Er sandte am 10. Juni 1910:

---

[1]) Maspero, Guide to the Cairo Museum. Cairo 1910. B. Case C. Servants daubing with pitch the inside of the yars. Auch Borchardt beschreibt und bildet ab, daß vor dem Abfüllen des Bieres in Ägypten immer eine Manipulation mit den Krügen vorgenommen wurde, die wohl als ein Ausschmieren zu deuten ist. Diese letztere Notiz verdanke ich der liebenswürdigen Hilfe meines Herrn Kollegen Prof. Sethe.

[2]) Ich danke Herrn Forstmeister Kautz auch an dieser Stelle für alle die vielseitige Unterstützung, die er dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Fichtenhumus I unter Nadeldecke aus Distrikt 94 (400 m hoch), frischer Osthang, Grauwackeverwitterungsboden, sandiger Lehm, fast voller Bestandesschluß, daher volle Beschattung, 50-jährige Fichten.

Fichtenhumus II unter einer aus Moos und Nadelstreu zusammengesetzten Decke aus Distrikt 101 (600 m hoch), Hochebene, ziemlich frisch. Grauwackeboden wie voriger. Bestandesschluß (Beschattung) 0,7 des Vollbestandes.

Buchenhumus unter Buchenlaubstreu, Distrikt 98 (420 m hoch), frischer SO-Hang. Grauwackeboden wie voriger. Beschattung 0,9 des Vollbestandes. 116-jährige Buchen.

Am 29. Juli 1910 folgte:

Fichtennadelhumus III an warmer SW-Ecke, gesammelt in Distrikt 8 a, bereits 7 Jahre freiliegend und doch noch keinen Pflanzenwuchs, nicht einmal Gräser zeigend. Höhenlage 420 m über NN. Grundgestein Grauwacke, Verwitterungsprodukt sandiger Lehm. Die drei ersten dieser Versuchsböden wurden in Zinkblechvegetationsgefäße gefüllt, auf deren Boden hohl ein Siebboden lag. Der Raum zwischen diesen Böden steht durch Röhren, welche nach oben durch die eingefüllte Versuchserde hindurchgehen, mit der Außenluft in Verbindung. Auf diese Weise wurde für genügende Durchlüftung des Topfinhaltes gesorgt. Jeder Topf faßte ungefähr 10 kg des Waldhumus. In jedem Gefäß wurden zehn Buchweizenpflanzen gezogen, welche Pflanze für derartige Vegetationsversuche im Topf sehr geeignet ist, weil sie sich kräftig und schnell entwickelt und durch Parasiten kaum geschädigt wird. Die Pflanzen wurden geerntet, als die ersten Samen durch Braunfärbung ihre Reife anzeigten. Die lufttrockene oberirdische Erntesubstanz wog in Gramm pro Topf in:

Buchenhumus	Fichtenhumus I	Fichtenhumus II
65,0	36,5	38,7
73,4	42,1	47,8
85,6	31,4	46,8
76,4	43,5	43,0
83,7	32,7	55,0
73,8	Mittel: 37,2	46,3
75,5		
77,7	Ganz trocken: 31,91	40,17
Mittel: 76,4		
Ganz trocken: 65,63		

Also wächst entschieden Buchweizen in Fichtenhumus nur etwa halb so kräftig, wie im verwendeten Buchenhumus (siehe Tafel 1). Im Jahre 1911 wurden die Humussorten in denselben Töpfen wieder ebenso bepflanzt, aber vorher die beiden Fichtenhumussorten vereinigt, durch eine kleine Menge neu aus der Oberförsterei Sieber gesandten Fichtenhumus ergänzt und gemischt. Die Buchweizenpflanzen blieben in dem Fichtenhumus ganz klein und kümmerlich, im Buchenhumus entwickelten sie sich viel besser, wenn auch lange nicht so gut, wie im Jahre vorher. Nach Buchweizen wurde als zweite Pflanze Grünkohl gebaut, der sich im Buchenhumus noch mäßig entwickelte, im Fichtenhumus gleich abstarb. Die auffallende und ungewöhnliche Ungleichheit der Buchweizenpflanzen im Buchenhumus führe ich ebenso wie den starken Befall des Grünkohles durch Blattläuse, der auch auf vielen mit gewöhnlichen Ackererden gefüllten Töpfen hervortrat, auf die große Lufttrockenheit des Jahres 1911 zurück, deren unheilvolle Wirkung auf die Pflanzen auch in Töpfen durch Gießen nicht aufgehoben werden kann.

Die Erntetrockensubstanzzahlen pro Topf in Gramm des Jahres 1911 sind folgende:

Fichtenhumus	Buchenhumus	
Buchweizen	Buchweizen I. Ernte	Grünkohl II. Ernte
0,5	25,1	0,9
0,3	20,0	2,6
0,32	18,9	3,6
0,62	4,1	1,2
0,8	19,4	0,8
0,72	9,85	1,7
0,45	15,8	2,4
0,44	18,0	5,4
0,5	3,3	0,9
0,72	Mittel: 14,94	2,2
0,65		
0,41		
Mittel: 0,5		

Im Sommer 1912 blieben die Versuchstöpfe mit Buchen- und Fichtenhumus unbepflanzt stehen, im Sommer 1913 wurde jede Humussorte mit Bucheckern und Fichtensamen besät, um die den Forstmann hauptsächlich interessierende Entwicklung des Waldbaumnachwuchses in diesen beiden Humussorten zu studieren. Es zeigte sich, daß Rotbuchen und Fichten im Buchenhumus normal aufgingen und sich gut entwickelten, während beide Pflanzenarten im Fichtenhumus mangelhaft aufgingen und diese Keimpflanzen im Laufe des Sommers abstarben, so daß im Herbst 1913 die Buchenhumustöpfe mit kräftigen Keimpflanzen bestanden waren, während die Fichtenhumustöpfe überhaupt keine lebenden Keimpflanzen von Fichte und nur einige schwächliche von Buche noch enthielten. Also selbst die Fichten, von denen man doch eine Anpassung an die Bestandteile des Fichtenhumus hätte erwarten sollen, waren schon im ersten Sommer im Fichtenhumus zugrunde gegangen.

Es fragt sich nun, warum diese Versuchspflanzen in Fichtenhumus sichtlich schlechter wuchsen, wie in Buchenhumus. Hervorzuheben ist, daß dieses schlechte Wachstum auch bei Kultur außerhalb des Waldes in Töpfen hervortrat. Die Töpfe standen stets frei in der Sonne unbeschattet. Also war der wachstumshemmende Einfluß des Nadelwaldschattens hier ausgeschaltet. Auch die Einflüsse der Wurzelkonkurrenz konnten in Töpfen, wo keine Wurzeln von Nachbarpflanzen störten, nicht in Frage kommen. Ebensowenig die Wasserversorgung, welche in Fichtenhumus im Walde vielleicht ungünstiger ist; die Töpfe mit Fichten- oder Buchenhumus wurden aber gleichmäßig durch Gießen feucht gehalten, also konnten die Pflanzen in Fichtenhumustöpfen nicht aus Wassermangel schlechter wachsen.

Es bleibt nun noch die naheliegende Vermutung zu prüfen, ob Fichtenhumus vielleicht durch Nährstoffarmut ungünstig auf die Pflanzenentwicklung wirkt. Deshalb wurden unsere Humussorten auf Gehalt an den Hauptpflanzennährstoffen untersucht. Der ausschlaggebende derselben ist der Stickstoff, der im Boden vorzugsweise als Salpeter den Pflanzen verfügbar sein muß. Früher glaubte man, daß der Waldboden keine Nitrate enthalte (vergl. die Literaturzusammenstellung bei Weis). Weis hat aber dann in einer sehr sorgfältigen Arbeit Nitrate in Wald- und Heideboden quantitativ nachgewiesen.

Dementsprechend untersuchten wir unsere Humussorten auch auf Salpetergehalt. Das Tempo der Salpeterbildung aus dem Gesamtstickstoff des

Bodens, also die Geschwindigkeit der Umbildung der organischen Stickstoffverbindungen der Pflanzenreste durch Bakterien in Ammoniak und weiter in Salpetersäure ist nach dem Gesagten ein gutes Maß für die „Tätigkeit“ eines Bodens, deshalb haben wir auch die Zunahme an Salpeter in unseren Waldhumussorten fortlaufend verfolgt.

Wir fanden bei Beginn der Versuche in Milligramm in 100 g trockenem Boden:

	Gesamtstickstoff	Salpeterstickstoff
Buchenhumus	979,7	18,78
Fichtenhumus I	1284,7	26,98
„ II	1384,3	9,75
„ III	1250,2	8,6

Zum Vergleich sei bemerkt, daß unser guter lehmiger Versuchsfeldboden in der Ackerkrume etwa 130 mg Gesamtstickstoff und etwa 1 mg Salpeterstickstoff pro 100 g Boden enthält. Der fortwährend neu sich bildende Salpeter wird nämlich durch das Regenwasser immer aus der Ackerkrume ausgewaschen und deshalb hält sich der Salpeterstickstoffgehalt immer annähernd auf derselben mäßigen Höhe. Der Vergleich der Versuchsfeldbodenanalyse mit denen der Waldhumussorten zeigt, daß die letzteren enorm viel reicher an Stickstoff und Salpeter sind, wie der Versuchsfeldboden. Und zwar ist Buchenhumus etwa 7-, Fichtenhumus etwa 10mal so reich an Gesamtstickstoff, wie unser Feldboden. Und im Salpeterstickstoff ist Buchenhumus 19-, Fichtenhumus I 27mal so reich wie unser Feldboden, die beiden anderen Fichtenhumussorten sind ärmer an Salpeter als Fichtenhumus I. Das Fortschreiten der Salpeterbildung, also die „Tätigkeit“ des Waldhumus, zeigen folgende Zahlen:

	Humussorten		
	Buche	Fichte I	Fichte II
	mg Salpeterstickstoff in 100 g trockenem Humus		
20./6. 1910	18,78	26,98	9,75
28./10. 1910	66,21	48,03	38,58
11./5. 1911	75,12	54,91	42,2
17./10. 1911	93,6	—	51,41

Die in Zinkblechvegetationsgefäßen der oben beschriebenen Art und im Freien vor Regen geschützt aufbewahrten aber feucht gehaltenen Humussorten zeigen also eine enorme Steigerung des Salpetergehaltes und zwar merkwürdigerweise der Buchenhumus viel stärker wie der Fichtenhumus, trotzdem der Gesamtstickstoffgehalt, aus dem doch der Salpeter entstehen muß, viel niedriger im Buchenhumus ist wie im Fichtenhumus. Darauf kommen wir später noch zurück.

Der Salpeterstickstoff wurde durch Reduktion mit Zink und Eisen in alkalischer Lösung von uns bestimmt. Es können Zweifel entstehen, ob diese Methode zuverlässige Resultate ergibt bei einem an organischen Stickstoffverbindungen so reichen Material wie dies Waldhumus ist; aus den genannten Verbindungen kann sich Ammoniak abspalten und dieser bei der Analyse fälschlich als aus Salpeterstickstoff entstanden angenommen werden. Es wurden deshalb Vergleichsbestimmungen nach der Schlösingschen Methode, die die erwähnte Fehlerquelle vermeidet, ausgeführt und sowohl in Buchen- wie in Fichtenhumus ziemlich genau dieselbe Nitratstickstoffmenge gefunden, wie nach der alkalischen Reduktionsmethode, nämlich in je 500 ccm Humusauszug an Nitratstickstoff in Milligramm:

	Buche	Fichte
Nach Schlösing	8,92	26,92
„ Reduktionsmethode. . .	10,08	27,44

Folglich können unsere oben angeführten, nach der Reduktionsmethode erhaltenen Zahlen als zuverlässig angesehen werden.

Übrigens findet man nicht immer im Waldhumus so hohe Nitratmengen, wie in dem von uns untersuchten Harzer Humus. Wir haben z. B. neuerdings Buchen- und Fichtenhumus aus der Göttinger Gegend untersucht, der gar kein Nitrat enthielt. Der Nitratgehalt des Humus dürfte ganz von dem Zersetzungszustand desselben abhängen. Dadurch wird sich auch zum Teil erklären, warum die Autoren (Migula, Boussingault, Weis) über die Nitratbildung im Waldhumus so verschiedener Meinung sind.

Außerdem bestimmten wir auch den Gehalt der Waldhumusproben an den wichtigsten sonstigen Pflanzennährstoffen und fanden folgende Werte, denen zum Vergleich diejenigen unseres im landwirtschaftlichen Betriebe recht gute Ernten gebenden Versuchsfeldbodens beigesetzt sind:

Pro 100 g trockenen Bodens oder Waldhumus fanden wir in dem durch Ausziehen mit heißer konzentrierter Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,15 hergestellten Extrakt in Gramm:

	CaO	P_2O_5	K_2O
Versuchsfeldboden . . .	0.81	0,11	0,10
Fichtenhumus	0,54	0,22	0,13
Buchenhumus	0,62	0,23	0,26

Die beiden Waldhumussorten waren also an Phosphorsäure und Kali reicher wie unser Feldboden. Nach allen diesen analytischen Bestimmungen im Waldhumus ist es nicht wahrscheinlich, daß das schlechtere Wachstum des Buchweizens in Fichtenhumus auf Nährstoffmangel zurückzuführen ist.

Wahrscheinlicher ist die Gegenwart eines Giftes in dem Fichtenhumus, welches die Pflanzenentwicklung hindert. Vielleicht entstehen solche Gifte bei gewissen Humusbildungsprozessen. Darauf deuten mancherlei Erfahrungen an Moorböden, ihr Kampf mit dem Walde, ihre langsame Umsetzung und ähnliche Erscheinungen bei Entstehung des Trockentorfs im Walde. Dabei ist zu bemerken, daß unser Fichtenhumus ganz schwachsaure Reaktion zeigte, der Buchenhumus nicht. Derartige, auf Humussäuren zurückgeführte Reaktion des Bodens soll die Pflanzen schädigen. Hier war die sauere Reaktion so gering, daß sie wohl kaum als Grund des schlechteren Buchweizenwachstums im Fichtenhumus angesehen werden konnte.

Jedoch haben wir durch Zusatz von CaO und CaO_3 zum Fichtenhumus auch diesen Punkt neuerdings zu untersuchen begonnen. Fichtensämlinge scheinen nach Kalkzusatz besser zu wachsen, so daß der geringe Säuregehalt des Fichtenhumus doch schon schädlich auf die Pflanzen wirken dürfte.

Zweitens kommen in derselben Richtung giftige Stoffwechselprodukte der Nadelbäume im Sinne der oben angeführten Vermutung des Herrn Geheimrat Wallach in Frage. Diesen letzteren Punkt habe ich nun zunächst zum Gegenstand einiger Versuche gemacht, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden sollen.

Als Vertreter der ätherischen Öle wurden benutzt Terpentinöl, Carven, verschiedene Bornylester, Edeltannennadelöl, Kiefernöl, zum Vergleich Eucalyptusöl, von sonstigen Stoffwechselprodukten der Koniferen Tannin, Ameisensäure, Kolophonium, griechisches Harz der Pinus halepensis.

Carven = d-Limonen ist der Hauptbestandteil des Öles aus Pomeranzenschalen, Dill und Kümmel.

Borneol ist ein Alkohol aus dem Sekrete von Dryobalanops (Borneokampfer). Dieser Alkohol und seine Ester, besonders der mit Essigsäure sind sehr häufige Sekretbestandteile. Rechtsborneol ist Dryobalanops-Kampfer. Linksborneol findet sich in Blumea balsamifera, neben i-Borneol in Valeriana. Linksborneolazetat kommt vor in Abies pectinata, Tsuga canadensis, Pinus nigra, Nadeln von Picea excelsa, Pinus montana, Larix sibirica, Satureja, Thymus. Rechtsborneol ist enthalten in Rosmarinum und Lavandula Spica. Edeltannennadelöl ist ein technisches Produkt, welches in der Fabrikation ätherischer Öle benutzt wird und welches mir die bekannte Firma Schimmel & Cie. freundlichst zur Verfügung stellte.

Versuche mit Keimpflanzen.

Es wurde der Einfluß von Terpentin und Carven auf keimende Samen geprüft. Es wurden Blumentöpfe mit je 5 kg lehmiger Ackererde mit $^1/_5$ Sandzusatz gefüllt, wechselnde Mengen Terpentin oder Carven in die Erde gebracht und pro Topf fünf vorgekeimte Samen der Zwergmaissorte Nanerottolo ausgelegt, welche eben die Keimwurzel zeigten.

Von 25 ausgesäten Samen wurden erzielt:

In 5 Töpfen ohne Zusatz 23 ausgewachsene Pflanzen,
„ 5 „ mit 5 ccm Carven pro Topf 12 ausgewachsene Pflanzen,
„ 5 „ „ 20 ccm Terpentin pro Topf 0 ausgewachsene Pflanzen.

Terpentin und Carven wirken also schädlich auf Keimpflanzen. Durch 20 ccm Terpentin pro Topf wurden alle Keimpflanzen getötet, durch 5 ccm Carven die Hälfte.

Eine weitere Serie ergab aus 25 Samen:

In 5 Töpfen ohne Zusatz 23 erwachsene Pflanzen,
„ 5 „ mit 5 ccm Terpentin 18 erwachsene Pflanzen,
„ 5 „ „ 10 ccm Terpentin 15 erwachsene Pflanzen.

Also wächst in diesen beiden Serien die Stärke der Schädigung mit der Menge des zugesetzten Terpentins. Die am Leben gebliebenen Pflanzen entwickeln sich weiter normal und bringen reife Samen. Die schädliche Wirkung der Zusätze erstreckte sich bei dieser Versuchsanordnung also nur auf die ersten Keimungsstadien.

Ähnliche Versuche wurden mit Zusatz von 10 ccm Edeltannennadelöl pro Topf angestellt. Im ganzen wurden aus 25 Samen 22 Pflanzen erzielt und zwar 5 große, 16 mittlere und 1 kleine. Das Edeltannenöl schädigte also die Keimpflanzen wenig, die überlebenden Pflanzen waren aber auch im erwachsenen Zustande noch auffallend hell gefärbt, die Chlorophyllbildung scheint also durch das Öl herabgesetzt zu werden.

Von sonstigen Stoffwechselprodukten unserer Nadelwaldbäume wurde in diesen Versuchen Ameisensäure verwendet und zwar pro Topf 5 g. Von 25 in fünf Töpfe ausgelegten Samen wurden nur sechs Pflanzen erzielt, also schädigte die Ameisensäure die Keimpflanzen sehr stark. Die überlebenden Pflanzen entwickelten sich aber auch hier weiter.

Weiter wurden zu Töpfen der angegebenen Größe je 200 g gemahlene Fichtennadeln aus dem Vorjahre gesetzt, die mit dem Boden gut vermischt wurden. Aus allen ausgelegten vorgekeimten Maissamen entwickelten sich Pflanzen, die aber gegen die Vergleichspflanzen, die in dem Boden ohne

Nadelzusatz erwuchsen, auffallend klein blieben (siehe Tafel 4). Diese Wachstumshemmung ist aber meines Erachtens nicht auf Giftwirkung ätherischer Öle oder anderer in den Nadeln enthaltener spezifischer Stoffwechselprodukte zurückzuführen, sondern auf Begünstigung der Tätigkeit salpeterzerstörender Bakterien im Boden durch die Zellulose der Nadeln. Diesen Punkt werde ich in anderem Zusammenhange später in dieser Arbeit besprechen.

Ein Zusatz von 5 g Tannin oder 2 g Kolophonium pro Topf ließ in ähnlichen Versuchen keine Schädigung der Maiskeimpflanzen erkennen. Diesen Resultaten gegenüber war es auffallend, daß Terpentin und Carven keine Giftwirkung erkennen ließen, wenn in Erde, die mit diesen Zusätzen versehen war, ruhende, also nicht vorgekeimte Samen, wie in den bisherigen Versuchen ausgelegt wurden. Für diese Versuche wurden wieder Blumentöpfe von je 5 kg Erdinhalt und dieselbe lehmige Ackererde wie oben verwendet. Die Töpfe erhielten einen Zusatz von 10 oder 20 ccm Terpentin oder 5 ccm Carven und wurden nachher mit ruhenden Samen von Weizen, Roggen, Buchweizen, Erbsen, Raps oder Blumenkohl dicht belegt. Jeder Topf erhielt nur eine Samensorte. Die Pflanzen entwickelten sich trotz der Zusätze normal und wurden kultiviert bis sie etwa handhoch waren.

Versuche mit älteren Pflanzen.

Je fünf Maispflanzen der Sorte Nanerottolo wurden in Blumentöpfen der in den vorher erwähnten Versuchen benutzten Größe, die mit Felderde gefüllt waren, kultiviert, bis sie etwa 25 cm hoch waren. Dann wurden einige Löcher in die Erde solcher Töpfe gestoßen und die unten angegebenen Zusätze einlaufen lassen, worauf die Löcher wieder zugedrückt wurden. Nach Zusatz von 10 ccm Edeltannennadelöl welkten die Maispflanzen bald, erholten sich aber wieder, sahen aber nach einigen Tagen sehr hell aus, so daß auch in diesen Versuchen, wie in den oben erwähnten, das Edeltannennadelöl die Chlorophyllbildung des Maises beeinträchtigte. Nach vier Wochen sahen alle Pflanzen gesund und normal aus.

Zusatz von 10 ccm Carven ließ die Pflanzen gleichfalls welken, nach 10 Tagen waren die Blätter noch gerollt, nach vier weiteren Wochen hatten sich drei von den fünf ursprünglichen Pflanzen des Topfes erholt, waren aber niedrig geblieben.

Zusatz von 10 ccm Terpentin ließ die Pflanzen welken, nach 10 Tagen hatten sie sich erholt und entwickelten sich weiter normal.

Bei Zusatz von 20 ccm Terpentin zu einem Topf welkten die Pflanzen und zwei erholten sich nicht wieder, während die drei anderen sich erholten und normal weiter entwickelten. Auch in diesen Versuchen tritt hervor, daß die Giftwirkung des Terpentins und Carvens nach einiger Zeit schwindet. Ob dies darauf beruht, daß die zugesetzten ätherischen Öle vom Boden adsorbiert und dadurch unwirksam werden oder ob dasselbe durch chemische Umwandlung der Öle im Boden erreicht wird, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Auf die eine oder andere Weise kann sich vielleicht auch erklären, warum bei Auslegung ruhender Samen die Giftwirkung von Terpentin und Carven nicht hervortrat. Vielleicht erreichten die Samen das Keimungsstadium hier erst, als die Giftwirkung der Zusätze schon aufgehoben war. Nachzuprüfen bleibt freilich, ob nicht die dichtere Belegung der Töpfe mit Samen in dieser Versuchsreihe das abweichende Resultat bedingte, indem der giftige Einfluß des Zusatzes sich dann auf viel mehr Samen verteilte.

als in den Versuchen mit vorgekeimten Samen, wo nur fünf Maissamen pro Topf verwendet wurden.

Einfluß von Dämpfen ätherischer Öle auf ältere Pflanzen.

Etwa 10 cm hohe Pflanzen von Impatiens Sultanii wurden unter Glasglocken in das Gewächshaus gestellt und gleichzeitig unter die Glocke ein Schälchen mit einigen Kubikzentimetern Terpentin gebracht. Nach kurzer Zeit verfärbten sich die Blüten der Impatiens und bald wurden auch die Laubblätter welk und hingen schlaff am Stengel herab, wie die beigegebene Tafel 2 zeigt. Eine Giftwirkung des Terpentindampfes ist hiernach unverkennbar und es mag nur vorerst dahingestellt bleiben, ob das Terpentin direkt oder das daraus entstehende Ozon oder Wasserstoffsuperoxyd bleichend und giftig auf die Impatiens gewirkt hat.

Weitere Versuche wurden mit Winterraps- und Kressekeimpflanzen (Lepidium sativum) angestellt und dabei außer Terpentin auch die Bornylester, Carven und Edeltannennadelöl verwendet. Die Keimpflanzen wurden, nachdem sie die Cotyledonen entfaltet hatten, unter die beschriebenen Glocken gestellt. Die in der beigegebenen Tabelle zusammengestellten Versuchsresultate zeigen deutlich die bleichende Wirkung von Terpentin und Carven und den teilweise bis zur Tötung sich steigernden giftigen Einfluß der sämtlichen verwendeten ätherischen Öle und Ester. Bemerkenswert ist die verschiedene Empfindlichkeit von Kresse und Raps gegen verschiedene Substanzen (siehe Tafel 3 und 4). So wird Kresse schneller durch Terpentin wie durch Carven getötet, während Rapspflanzen umgekehrt durch Carven stärker gebleicht werden, wie durch Terpentin und durch Carven getötet werden, während sie sich erholen, wenn sie aus dem Terpentindampfe herausgenommen werden. Auffallend ist die dunkelgrüne Färbung, welche die Cotyledonen der Rapskeimlinge in Bornylazetatdampf zeigen.

Edeltannennadelöl tötet Kresse, aber nicht Raps.

Versuche mit niederen Organismen.

Nachdem gezeigt war, daß höhere Pflanzen durch die verwendeten Substanzen geschädigt wurden, stellten wir ähnliche Versuche mit niederen Organismen an, weil hierbei eine quantitative Bestimmung des schädigenden Einflusses auf die Lebensfunktionen besonders gut durchführbar ist und weil die meisten der benutzten niederen Organismen Bodenbewohner sind, welche die Ernährung der höheren Pflanzen beeinflussen. Zuerst wurden einige orientierende Versuche über die Vermehrung und Gärtätigkeit von Hefe angestellt. Je 100 ccm Rosinenmost wurden in mit Schwefelsäuregärverschluß verschlossenen Flaschen nach Zusatz der zu prüfenden ätherischen Öle und Ester mit Reinkultur der Weinhefe Oppenheimer Kreuz versetzt und von Zeit zu Zeit durch Bestimmung der Gewichtsabnahme der Gärflasche, die durch Gärung gebildete Kohlensäuremenge ermittelt. Die eine Versuchsreihe war mit schwacher Hefeaussaat (1 Million Zellen pro 100 ccm Most) versehen, um die eventuelle retardierende Wirkung auf die Hefevermehrung stärker hervortreten zu lassen. Es zeigte sich, daß Carven Hefevermehrung und Gärung in der angewandten Zusatzstärke von 1 Proz. völlig verhindert. Alle anderen schwächen die Hefevermehrung, Bornylvalerat hemmt bei starker Aussaat die Gärung fast gar nicht, auch bei schwacher

Aussaat nicht wesentlich und dementsprechend ist auch bei schwacher Aussaat die Einwirkung auf die Hefevermehrung gering.

Bornylazetat schädigt sowohl die Hefevermehrung, wie die Gärung recht stark, vielleicht spielt die große Giftigkeit der Essigsäure für Hefe dabei eine Rolle mit. Bezüglich der Gärung, aber nicht hinsichtlich der Hefevermehrung verhält sich Bornylformiat ähnlich, was wieder mit der starken Giftigkeit der Ameisensäure vielleicht Beziehung hat. Beide Bornylester verlangsamen bei schwacher Aussaat besonders die Angärung und lassen bei schwacher und bei starker Aussaat die Moste nicht ganz zur Durchgärung kommen. Hier ist damit zu rechnen, daß die Giftwirkung des durch Gärung gebildeten Alkohols sich zu der der Ester addiert und so die Gärung vor Verbrauch des vorhandenen Zuckers zum Stillstand kommt. Auch Edeltannenöl und Terpentin in beiden Konzentrationen schädigten Hefevermehrung und Angärung und lassen bei starker Aussaat die Gärung nicht ganz zur Vollendung kommen. Aufzuklären bleibt, warum bei starker Aussaat 10 Proz. Terpentin nicht heftiger, sondern weniger wirkt wie 1 Proz.

Tabelle 1.

Einwirkung von Dämpfen ätherischer Öle auf Kresse- und Rapskeimpflanzen.

Terpentin	Carven	Bornyl-azetat	Bornyl-formiat	Bornyl-valerat	Edeltannen-nadelöl
Bleicht Raps, später aus dem Dampf herausgenommen, erholen sich die Pflanzen, bleiben aber noch lange Zeit heller als die Vergleichspflanzen. Kresse tötet Terpentindampf schnell	Bleicht Raps stärker wie Terpentin. Die aus dem Dampf herausgenommenen Pflanzen sterben meist ab. Kresse wird getötet, aber später wie durch Terpentin und ohne vorherige Bleichung	Rapscotyledonen nach zwei auffallend dunkel blaugrün, am 4. Tage tot. Kresse nach 2 Tagen normal, am 4. Tage tot	Raps nach zwei Tagen normal am 4. Tage tot. Kresse am 4. Tage noch normal, nach 7 bis 8 Tagen tot	Kresse u. Raps am 4. Tage normal. Am 10. Tage Raps teilweise tot, Kresse zeigt vertrocknete Blätter, Pflanzen meist tot	Kresse u. Raps am 4. Tage noch normal, am 10. Tage Raps noch gesund, Kresse stirbt ab, wobei die Cotyledonen von den Insertionsstellen aus hell werden

Tabelle 2.

Versuche in je 100 ccm Rosinenmost-Aussaat pro Versuch 1 000 000 Zellen der Reinhefe (Gramm CO_2 gebildet durch Gärung).

Zahl der Tage	Ohne Zusatz	1% Bornyl-formiat	1% Bornyl-valerat	1% Bornyl-azetat	1% Carven	1% Edel-tannen-nadelöl	1% Ter-pentin	10% Ter-pentin
2	2,6	0,9	1,8	0,7	0	1,0	0,8	0,3
3	4.8	3,1	4,1	2,5	0	3,7	3,2	2,5
4	6,2	4,3	5,6	4,0	0	5.5	4,9	4,2
6	7,3	5,4	7,2	5,9	0	7,2	6,6	6,1
7	7,4	5,55	7,3	6,15	0	7,3	6,8	6,25
14	7,4	5,55	7,3	6,35	0	7,3	6,95	6,3
Million Hefezellen pro ccm am Schluß .	71,2	60,4	66,4	38,4	0	56,8	52,4	45,6

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle 3.

Versuche in je 100 ccm Rosinenmost. Aussaat pro Versuch 1400 Millionen Hefezellen (Gramm CO_2 gebildet durch Gärung).

Zahl der Tage	Ohne Zusatz	1% Bornylformiat	1% Bornylvalerat	1% Bornylazetat	1% Carven	1% Edeltannennadelöl	1% Terpentin	10% Terpentin
2	4,4	3,2	4,2	4,1	0	2,2	3,4	4,4
3	7,1	4,9	6,4	5,9	0	4,1	5,5	6,8
4	8,4	5,7	8,0	6,8	0	5,8	7,1	8,1
5	8,8	6,0	8,4	6,9	0	6,7	7,7	8,4
7	9,0	6,1	8,8	7,0	0	7,8	8,3	8,6
9	9,1	6,15	8,85	7,0	0	8,0	8,4	8,7
17	9,15	6,2	9,0	7,0	0	8,05	8,4	8,7

Tabelle 4.

150 ccm Most mit 1 Million Reinhefe „Oppenheimer Kreuz“. (Gramm CO_2 entwickelt.)

Tag	Ohne	5% griechisches Harz	1% Kiefernöl	5% Kolophonium
2.	0,3	0	0	0
3.	2,7	2,4	0,1	1,9
4.	4,3	4,0	0,3	3,9
6.	7,5	7,1	3,7	7,1
7.	8,6	8,3	5,0	8,1
8.	9,3	9,1	6,0	8,8
10.	10,1	10,1	7,9	9,8
13.	10,3	10,4	9,1	10,2
21.	10,5	10,5	10,4	10,6
25.	10,5	10,6	10,6	10,6

Tabelle 5.

100 ccm Most + Eucalyptusöl, besät mit Reinhefe. 1 Tropfen Öl = 0,02 ccm (Gramm CO_2 entwichen).

Tage	Ohne Öl	1 Tropfen Öl	5 Tropfen Öl	10 Tropfen Öl	15 Tropfen Öl
1	0,4	0,35	—	—	—
2, Früh	1,9	1,65	1,05	0,8	0,5
2, Abends	2,8	2,55	1,5	1,1	0,5
3, Früh	4,2	4,25	2,9	1,9	0,9
4, „	6,0	6,05	5,0	3,2	1,4
5, „	7,3	7,25	6,7	4,2	1,8
8, „	8,3	8,15	8,2	5,8	2,4

Die dritte Versuchsreihe (Tab. 4) mit Hefe zeigt das Kiefernöl (Oleum Pini silvestris) viel giftiger als Edeltannennadelöl und daß das griechische Harz der Aleppokiefer ebenso giftig auf die Hefegärung wirkt wie die gleiche Menge Kolophonium. Das griechische Harz wird hiernach in der Praxis die Weingärung wenig hemmen, aber nachher giftig auf Kahmpilze und Essigbakterien wirken und so den Wein vor Verderben schützen.

Zum Vergleich wurde auch die Einwirkung von Eucalyptusöl, welches in der Medizin als kräftiges Antiseptikum bekannt ist, auf Hefe untersucht

(Tab. 5); es zeigt sich eine mit der Stärke des Zusatzes steigende Hemmung der Alkoholgärung.

Tabelle 6.

Zählung der Bakterien in Feldboden.

	Ohne Zusatz	1% Bornyl-formiat	1% Bornyl-valerat	1% Bornyl-azetat	1% Carven	1% Edel-tannen-nadelöl	1% Ter-pentin	10% Ter-pentin
Aussaat trockener Erde in mg . . .	0,01	0,00996	0,0098	0,00975	0,011	0,00926	0,011	0,0115
Zahl der Kolonien pro Platte: Parallelversuche	2988	2000	1956	1104	1758	2580	1893	2700
	1968	1500	2664	1392	2496	2826	6000	2532
	3684	1866	2097	1320	1335	3800	4446	2616
	2592	1524	1240	1428	1890	3750	2940	3000
Mittel	2808	1722	1989	1311	1870	3239	3820	2702
Wahrscheinlicher Fehler d. Mittels ±	245	83,5	196,4	52,3	160,8	208,2	600	68,3
Kolonienzahl pro g trockener Erde in Millionen.	281	173	203	134	170	350	347	235

Weiter wurde nun die Einwirkung der mehrfach erwähnten Substanzen auf die Bodenbakterien studiert und zwar zunächst auf die Zahl derselben. Angewendet wurde die in der Dissertation von Engberding (Centralbl. f. Bakter. Abt. II. Bd. 23. No. 21) angegebene Methode, wobei etwa 20 g natürlicher Feldboden mit sterilem Wasser soweit verdünnt wurde, bis 1 ccm Verdünnung etwa 0,01 mg trockener Erde entsprach. Dann wurde mit je 1 ccm dieser Verdünnung und Heydenagar Zählkulturen in Petrischalen hergestellt und die nach 9 Tagen sichtbar gewordenen Kolonien gezählt.

Die Bornylester setzen die Bakterienzahl stark herab, besonders wieder Formiat und Azetat, wo die Bakterienzahl rund nur halb so viel beträgt, wie in dem Vergleichsversuch ohne Zusatz. Stark giftig wirkt auch hier Carven, was sich auch in langsamerem Erscheinen der Kolonien auf der Platte zeigt. 10 Proz. Terpentin zeigt dagegen nur eine sehr geringe Erniedrigung der Bakterienzahl, während Edeltannennadelöl und 1 Proz. Terpentin auffallenderweise die Bakterienzahl erhöhen[1]).

Dann wurden Versuche über die Beeinflussung der Säurebildung in Milch durch die erwähnten Zusätze ausgeführt. Je 20 ccm Milch wurden nach zweitägigem Stehen mit Barytwasser, wovon etwa 27 ccm = 10 ccm $^1/_{10}$-Normalsäure unter Benutzung von Phenolphtaleïn als Indikator titriert. Es ergaben sich fast gar keine Unterschiede, nur bei Carven und Edeltannennadelöl wurde etwas mehr Säure gefunden.

	Ohne Zusatz	Bornyl-formiat	Bornyl-valerat	Bornyl-azetat	Carven	Edel-tannen-nadelöl	Terpentin	
		1%	1%	1%	1%	1%	1%	10%
Kubikzentimeter Bornylwasser	39	38	39	39	41,5	51	39	34

---

[1]) Unserer Annahme von der Giftwirkung der ätherischen Öle im Nadelwaldboden entsprechend wäre zu vermuten, daß im Nadelwaldboden weniger Bakterien wie im Laubwaldboden sich finden. Die Befunde von Konrad Schulz ergaben freilich das entgegengesetzte Resultat, beweisen aber nichts, weil die untersuchten Wälder zu verschieden alt waren.

Da die Möglichkeit vorlag, daß Kasein und andere ähnlich wirkende Bestandteile der Milch die zugesetzten ätherischen Öle adsorbiert und dadurch unwirksam gemacht haben konnten, so wurden die Versuche mit Molken wiederholt. Milch wurde mit etwas Lab auf 45° C erwärmt, nachher zur Ausscheidung des Albumins noch etwas höher erhitzt, filtriert und je 20 ccm des Filtrates mit Milchsäurebakterien geimpft, darauf wurde auch hier mit Phenolphtalein und Barytwasser titriert. Die untenstehenden Zahlen bedeuten Kubikzentimeter verbrauchten Barytwassers:

Nach Tagen	Ohne Zusatz	Bornylformiat	Bornylvalerat	Bornylazetat	Carven	Edeltannennadelöl		Terpentin
		1%	1%	1%	1%	1%	5%	1%
2	14	14	11,3	15,7	8,5	11,5	10	12
7	22	13	16	12	20	15	38,5	20

Nunmehr tritt eine immerhin bemerkenswerte Verlangsamung der Säurebildung unter dem Einfluß der meisten Zusätze hervor. Auffallend ist auch hier die deutliche Erhöhung der Säurebildung bei Zusatz von Edeltannennadelöl (5 Proz.). Der Grund bleibt aufzuklären. Jedenfalls kann an dieser Erscheinung nicht in dem Öl enthaltene freie Säure schuld sein, da die Säure in dem Zeitraum zwischen den beiden Untersuchungen sich stark vermehrt zeigte.

Sehr schön kann man die Hemmung der Bakterienentwicklung durch ätherische Öle auch mit Hilfe der Methylenblaureduktionsmethode demonstrieren, welche jetzt zur angenäherten Bestimmung des Bakteriengehaltes der Milch in der Praxis oft benutzt wird und darauf beruht, daß, je stärker die Bakterien sich vermehren, auch desto mehr reduzierende Enzyme von diesen gebildet werden und dementsprechend das Methylenblau um so schneller reduziert wird. Wir haben z. B. je 20 ccm Milch in Reagenzgläser gefüllt und je 2 Tropfen alkoholischer Methylenblaulösung zugegeben; außerdem wurde je ein Röhrchen mit steigenden Mengen Terpentin bzw. Kiefernöl versetzt. Die Methylenblauentfärbung ging bei 25° C in folgender Weise vor sich:

Nach Beginn des Versuchs Stunden	Terpentin			Kiefernöl			Ohne Zusatz
	1 ccm	½ ccm	$^1/_{10}$ ccm	1 ccm	½ ccm	$^1/_{10}$ ccm	
2	—	—	—	—	—	heller	entfärbt
3	—	—	heller	—	heller	entfärbt	—
8	—	etwas heller	entfärbt	entfärbt	entfärbt	—	—
24	nur noch eine Spur blau	entfärbt	—	—	—	—	—

24 Stunden nach Beginn des Versuches waren alle Proben durch Säurebildung koaguliert, mit Ausnahme derjenigen mit 1 ccm Terpentin; der Versuch zeigt klar die bakterienentwicklungshemmende Wirkung von Terpentin und Kiefernöl; ersteres ist sichtlich giftiger.

Versetzt man 25 ccm Milch mit einer Messerspitze gemahlenen Schwefel und hängt ein mit essigsaurem Blei getränktes Papier über der Kultur auf, so kann man an der Hemmung der durch Bakterien bewirkten Schwefelwasserstoffentwicklung die desinfizierende Wirkung von Stoffen, die man der Milch zusetzt, verfolgen. Wir setzten zu 25 ccm Milch je 0,5 oder 1 ccm Weißtannennadelöl, Kiefernöl, Terpentin oder ein Stückchen griechisches Harz und hielten die Proben bei 25°.

Stunden nach Beginn	Ohne Zusatz	Harz	0,5 Terpentin	1,0 Terpentin	0,5 Tanne	1,0 Tanne	0,5 Kiefer	1,0 Kiefer
24	schwarz	schwarz	weiß	weiß	etwas schwarz	etwas schwarz	weiß	weiß
30	„	„	„	„	„	„	„	„
45	„	„	„	„	„	„	„	„
54	„	„	„	„	schwarz	schwarz	„	schwarz
72	„	„	„	„	„	„	schwarz	„
120	„	„	schwarz	schwarz	„	„	„	„

Der Versuch zeigt sehr hübsch die desinfizierende Wirkung von Kiefernöl und noch stärker die von Terpentin, während Tannenöl kaum und Harz nicht wirkte.

Läßt man Bier in flacher Schicht an der Luft stehen, so entwickelt sich eine Decke von Kahmpilzen und Essigbakterien auf der Flüssigkeit, weil das Bier diese Organismen enthält. Wir setzen zu 25 ccm Bier dieselben Zusätze, wie in dem vorhergehenden Milchversuch und hielten das Bier bei 25°. Nach 2 Tagen war Bier ohne Zusatz oder mit Harz schon reichlich mit Essigbakterien und Kahm bedeckt, nach 11 Tagen enthielt der Versuch mit 0,5 ccm Weißtannennadelöl Kahmpilze und Essigbakterien in viel geringerer Menge als der Versuch ohne Zusatz und mit Harz, der Versuch mit 1 ccm Tannenöl wenig Kahm, aber keine Essigbakterien, beide Versuche mit Terpentin oder Kiefernöl waren ganz rein geblieben.

Auch diese Versuche sind also geeignet, die desinfizierende Wirkung von Terpentin und Kiefernöl, die schwächere von Tannenöl und die Unwirksamkeit des griechischen Harzes zu zeigen.

Nach diesen Vorversuchen wurden Versuche mit Bakterien angestellt, die für die Ernährung der im Boden wurzelnden Pflanzen wichtig sind.

Zuerst wurden Bakterien geprüft, welche Harnstoff unter Bildung von kohlensaurem Ammoniak hydrolysieren. In 20 ccm Bouillon mit 2 Proz. Harnstoff wurden die Zusätze eingebracht und mit einer Platindrahtöse einer Pferdemistaufschwemmung geimpft. Nach 5 Tagen wurden die Kulturen mit $^1/_{10}$ Normalschwefelsäure unter Benutzung von Lackmus als Indikator titriert.

Ohne Zusatz	Bornylformiat	Bornylvalerat	Bornylazetat	Carven	Edeltannennadelöl	Terpentin
	1%	1%	1%	1%	1%	1%
44,5	5,4	8,0	6,0	5,0	7,0	schwach alkalisch

Die angegebenen Zahlen bedeuten beim Titrieren verbrauchte Kubikzentimeter $^1/_{10}$ Normalsäure und zeigen, daß die Harnstoffhydrolyse durch alle Zusätze stark gehemmt war.

Genauere Versuche dieser Art wurden nach der Methode Krüger-Reich-Schittenhelm ausgeführt, wobei das gebildete Ammoniak überdestilliert und dann erst titriert wird[1]). Verwendet wurden wieder je 20 ccm 2-proz. Harnstoffbouillon, geimpft mit Pferdemistaufschwemmung.

---

[1]) Beschreibung der Methode siehe Abderhalden, Biochemische Arbeitsmethoden Bd. 3. p. 767.

Reihe	Nach Tagen	Ohne Zusatz	Ameisensäure		Carven	Terpentin	
			$^1/_{20}$%	¼%	1%	1%	5%
I	6	16,3	1,5	2,2	1,9	1,8	2,3
II	11	51,5	53,3	1,7	neutral	4,5	6,0

Die Zahlen bedeuten Milligramm Ammoniakstickstoff, welche aus je einer Kultur überdestilliert wurden. Ein Verlust von Ammoniak wurde durch Aufsetzen von Schwefelsäureverschlüssen auf die Kulturen verhindert. Auch hier wirkten die Zusätze sämtlich stark hemmend auf die Hydrolyse; nur die Hemmung, die ein Zusatz von $^1/_{20}$ Proz. Ameisensäure hervorbrachte, wurde nach dem sechsten Tage überwunden.

Im Anschluß an diese Versuche über Ammoniakbildung aus Harnstoff seien solche über Salpeterbildung, also Oxydation des Ammoniaks zu Nitrat im Boden mitgeteilt. Je 2 kg Erde, bestehend aus 2 Teilen unseres Versuchsfeldlehmbodens und 1 Teil Sand wurden mit 44,22 mg Ammoniakstickstoff pro 100 g trockenen Bodens (2 g schwefelsaurem Ammoniak pro Gramm feuchten Bodens) in Form von schwefelsaurem Ammoniak versetzt, in weithalsige Pulvergläser gebracht und ständig bei ca. 25° auf 18 Proz. Feuchtigkeit gehalten. Diese am 4. Juli 1911 angesetzte Serie wurde am 29. September durch eine weitere ergänzt, die ein Bodengemisch aus 4 Teilen Versuchsfelderde und 1 Teil Sand erhielt und pro 100 g trockenen Boden 45,96 mg Ammoniakstickstoff als Ammonsulfat zugesetzt erhielt. Diese nachträglich zugefügten Flaschen erhielten die Zusätze von Kolophonium und Tannin. Beide Serien wurden nach den gleichen Zeitabschnitten, gerechnet vom Tage des Ansetzens des Versuches, auf Nitratstickstoff untersucht.

Versuche über Salpeterbildung.
Die Zahlen bedeuten Milligramm Salpeterstickstoff in 100 g trockenem Boden.

Untersucht nach Tagen	Ohne Zusatz	2 ccm Bornylformiat	2 ccm Bornylvalerat	2 ccm Bornylazetat	2 ccm Carven	5 ccm Carven	5 ccm Edeltannennadelöl	20 ccm Edeltannennadelöl	5 ccm Terpentin	10 ccm Terpentin	20 ccm Terpentin	1% Ameisensäure	5‰ Ameisensäure	10% Fichtennadeln	20% Fichtennadeln	2% Kolophonium	1% Tannin	10% Tannin	20% Tannin
37	42,3	6,4	38,2	9,0	22,7	7,5	11,7	1,5	4,7	2,0	2,2	42,7	42,1	0,6	0,7	4,6	37,2	0,9	1,2
77	44,2	42,4	41,0	41,0	41,7	36,5	38,8	2,8	40,1	2,9	2,1	44,3	42,3	1,1	1,4	15,2	38,5	1,8	1,3
132	—	—	—	—	—	38,9	39,9	32,8	—	35,4	3,2	—	—	3,3	2,9	16,3	34,8	—	—
210	—	—	—	—	—	39,6	40,1	32,8	—	40,0	34,7	—	—	0,4	0,4	—	—	—	—

Die in vorstehender Tabelle zusammengestellten Zahlen zeigen, daß alle Zusätze, mit Ausnahme von Ameisensäure, die Nitratbildung schwächen. Gering ist diese Wirkung bei Bornylvalerat und 1 Proz. Tannin, stark bei allen anderen Zusätzen. Weiterhin wurde diese Hemmung oft überwunden, länger blieb sie bestehen bei den stärkeren Dosen Edeltannennadelöl und Terpentin, dauernd blieb sie merkbar bei Kolophonium und Tannin. Diese bei den meisten Zusätzen eintretende spätere Überwindung der anfänglichen Hemmung läßt es auch verstehen, warum wir trotz der Schädigung der Nitrifikation durch die Koniferenstoffwechselprodukte in unserem Harzer Fichtenhumus viel Salpeter fanden. Die ätherischen Öle und anderen Stoffwechselprodukte der Koniferen schädigen den Pflanzenwuchs also nicht durch dauernde Hemmung der Salpeterbildung, wohl aber zeigen unsere Salpeterbildungsversuche die Giftwirkung der Koniferenstoffwechselprodukte an dem Beispiel der salpeterbildenden Organismen.

Die geringen Mengen von Nitratstickstoff, die in den Versuchen mit Fichtennadelzusatz selbst nach 210 Tagen gefunden wurden, schienen mir ebenso wie die oben geschilderte Depression der Maisentwicklung infolge eines Zusatzes von Fichtennadeln zum Boden nicht oder nicht allein auf einer Giftwirkung der Nadelbestandteile, sondern darauf zu beruhen, daß die Zellulose der Nadeln salpeterumwandelnden Bakterien des Bodens als Energiequelle dient. Infolgedessen wird aus dem Salpeter des Bodens Bakterieneiweiß, und aus Mangel an Salpeter, der in erster Linie in Betracht kommenden Stickstoffnahrung, bleiben die Pflanzen klein und schwächlich. Diese Vermutung gründet sich auf an anderer Stelle beschriebene Versuche[1]), in denen ich in Töpfen dem Boden Zellulose in Form von Papier zusetzte, welches in der eben besprochenen Weise bewirkte, daß die geringen Salpetermengen, welche sich fortlaufend durch Bakterientätigkeit im Boden aus dessen stickstoffhaltigen Substanzen bilden, rückläufig immer wieder in Bakterieneiweiß verwandelt wurden. Deshalb blieb der Boden quantitativ frei von Salpeter, solange noch unzersetzte Zellulose da war, und während dieser ganzen, mehrere Jahre umfassenden Zeit blieben die eingesäten Pflanzen ganz klein. Sobald die Zellulose aber verbraucht war, blieb der sich fortwährend neu bildende Salpeter im Boden erhalten, und die Pflanzen wuchsen nun wieder. Um zu prüfen, ob meiner Vermutung entsprechend in derselben Weise in den Salpeterbildungsversuchen mit Fichtennadelzusatz wohl Salpeter entstände, aber unter dem Einfluß der Nadelzellulose und ähnlicher Bestandteile in Bakterienkörpersubstanz verwandelt würde, stellten wir Versuche mit Zusatz von salpetersaurem Natron und Fichtennadeln zu Boden an und verfolgten längere Zeit die Wandlungen des Salpeterstickstoffgehaltes in solchen Böden.

Ein Gemisch von 2 Teilen Versuchsfelderde und 1 Teil Sand hatte einen Nitratstickstoffgehalt von 2,09 mg pro 100 g trockener Erde und erhielt in Form von salpetersaurem Natron noch 22,25 mg Nitratstickstoff zugesetzt, so daß schließlich in 100 g trockener Erde 24,34 mg Nitratstickstoff enthalten waren. Versuch A erhielt diesen Nitratzusatz nicht, um das Anwachsen des Nitrates im Boden selbst zu verfolgen. Versuch B erhielt den oben bezeichneten Nitratzusatz, Versuch C ebenfalls und außerdem 200 g Fichtennadeln auf 2 kg Bodengemisch, welche für jeden Versuch verwendet wurden. Die Versuchsgefäße bestanden aus Glas. Versuch C, der den Nadelzusatz bekommen hatte, wurde auf 30 Proz. Wassergehalt erhalten, weil nach unseren früheren Untersuchungen bei diesem Wassergehalt in unserer Felderde die denitrifizierenden Bodenbakterien das Nitrat besonders energisch angreifen, es als Sauerstoffquelle infolge von Luftmangel benutzen und reduzieren. Versuch A und B wurden bei 18 Proz. Wassergehalt erhalten. Alle drei Versuche standen bei ca. 25° im Brutzimmer. Die Resultate enthält folgende Tabelle, deren Zahlen Milligramm Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde bedeuten.

Bei 30 Proz. Wasser ist in Versuch C schon nach 36 Tagen fast das ganze Nitrat verschwunden, die Bestandteile der Nadeln sind also als Energiequelle für die denitrifizierenden Bakterien gut geeignet. Die betreffenden Bestandteile scheinen aber schnell zersetzt und verbraucht zu werden, denn

---

[1]) Zeitschr. „Kali“ 1912. Heft 16.

Untersucht nach Tagen	A	B	C
	Ohne Nitratzusatz	Mit Nitratzusatz ohne Nadeln	Mit Nitratzusatz und Nadeln
	18% Wasser	18% Wasser	30% Wasser
Anfangs	2,1	24,3	24,3
36	3,4	25,4	0,9
123	6,5	27,9	2,6

bei der dritten Untersuchung nach 123 Tagen war das offenbar neugebildete Nitrat erhalten geblieben.

Meine Vermutung, daß die Depression des Pflanzenwachstums und die scheinbare Hemmung der Nitratbildung in mit Ammonsulfat gedüngter Erde durch Fichtennadeln wenigstens zum Teil nicht auf in den Nadeln enthaltene eigentliche Giftstoffe, sondern auf die Eignung gewisser Nadelbestandteile als Energiequelle für salpeterumsetzende Bakterien zurückzuführen sei, erscheint durch diese Versuchsreihe als richtig bestätigt.

Schwierig könnte es nur erscheinen, den hohen Nitratgehalt der Nadelstreu, den wir oben konstatiert haben, mit den in den eben besprochenen Versuchen konstatierten Tatsachen in Einklang zu bringen. Dazu ist zu bemerken, daß wir aus Versuch C der soeben diskutierten Versuchsreihe folgern können, daß die als Energiequelle für denitrifizierende Bakterien dienenden Nadelbestandteile schnell zersetzt werden und deshalb ihr Einfluß auf die Salpeterzersetzung gegenüber der fortwährenden kräftigen Salpeterneubildung in der Waldstreu nicht so energisch hervortritt, wie in unseren soeben besprochenen Versuchen mit Boden, dem Salpeter zugesetzt war oder in den Maiskulturversuchen, wo der Boden nur wenig Salpeter enthielt. Daß in unseren weiter oben referierten Versuchen der an Gesamtstickstoff reichere Fichtenhumus weit weniger Nitrat im Laufe von 16 Monaten bildete, wie der gesamtstickstoffärmere Buchenhumus, kann entweder durch die Giftwirkung der Fichtenbestandteile auf die salpeterbildenden Bakterien (siehe unsere Nitrifikationsversuche mit Zusätzen von ätherischen Ölen usw.) oder darauf zurückgeführt werden, daß die denitrifizierenden Bakterien Energiematerial in größerer Menge oder geeigneterer Beschaffenheit aus Fichtennadeln wie aus Buchenlaub beziehen können. Dasselbe zeigen Versuche, in denen Waldhumus mit Ammonsulfat versetzt wurde.

Salpeterbildung aus Ammonsulfat in Waldhumus.

Von jeder Humussorte (Buche, Fichte I und II; Erklärung der Herkunft siehe oben) wurden zwei Portionen à 3 kg abgewogen und zu je einer dieser Portionen 6 g Ammonsulfat gesetzt.

Der Anfangswassergehalt der Böden war bei:

Buche	49,21 %
Fichte I	48,19 %
Fichte II	53,64 %

Der Zusatz von N in Form von Ammonsulfat betrug also auf 100 g trockenen Humus bei:

Buche	83,48 mg
Fichte I	81,84 mg
Fichte II	91,46 mg.

Von Zeit zu Zeit wurde der Nitratstickstoffgehalt der Humussorten bestimmt. Folgende Tabelle enthält die Resultate in Milligramm Nitratstickstoff pro 100 g Humus.

Datum der Untersuchung	Buche ohne Ammonsulfat	Buche mit Ammonsulfat	Fichte I ohne Ammonsulfat	Fichte I mit Ammonsulfat	Fichte II ohne Ammonsulfat	Fichte II mit Ammonsulfat
20./6. 1910	18,78	18,78	26,98	26,98	9,75	9,75
28./10. 1910	66,21	87,97	48,03	47,55	38,58	42,39
11./5. 1911	75,12	102,1	54,91	52,8	42,2	47,5
17./10. 1911	93,57	104,21	—	—	51,41	73,61

Zieht man bei jeder Humussorte von der Nitratstickstoffmenge, die bei Ammonsulfatzusatz erhalten wurde, diejenige ab, die in der nicht mit Ammonsulfat versetzten gefunden wurde, so ergeben sich folgende Zahlen (Milligramm Nitratstickstoff pro 100 g trockenen Humus), welche den zu Nitrat oxydierten Ammonsulfatstickstoff angeben:

Datum der Untersuchung	Buche	Fichte I	Fichte II
28./10. 1910	21,8	negativ	3,8
11./5. 1911	27,0	negativ	5,3
17./10. 1911	10,6	—	22,2

Abgesehen von dem letzten Untersuchungstermin, wo die Verhältnisse vielleicht infolge von Neubildung von Nitrat aus dem aus Nitrat vorher gebildeten Bakterieneiweiß verworren sind, zeigt sich also in Buchenhumus eine ziemlich erhebliche Ammonsulfatoxydation, während diese in Fichtenhumus II sehr gering ist und in Fichtenhumus I sogar negative Werte zeigt. Diese Resultate kann man entweder dahin deuten, daß entsprechend unseren oben besprochenen Nitrifikationsversuchen Giftstoffe der Fichten im Fichtenhumus die Nitrifikation hemmen oder die Zellulose und ähnliche Bestandteile des Fichtenhumus besser wie die des Buchenhumus den salpeterumbildenden Bakterien als Energiequelle dienen.

Hier ist auch ein anderer naheliegender Punkt zu besprechen. Die Vermutung, welche wir soeben aussprachen, daß Buchenlaub sich durch Bakterien langsamer zersetzt und deshalb eine für die denitrifizierenden Bakterien langsamer angreifbare Energiequelle darstellt, wie Nadeln, schien eine Stütze in Versuchsreihen zu finden, die Franz Lehmann über die Verdaulichkeit von Buchenlaub und Kiefernnadeln anstellte. Er fand:

	Proteïn	Fett	Rohfaser	Stickstofffreie Extraktstoffe	Organische Substanz
100 Teile Buchenlaub enthalten verdauliche Substanz	0,6	0,7	5,7	20,5	27,5
Desgl. Kiefernnadeln . .	86,2	67,7	73,8	85,8	79,9

Buchenlaub hat demnach im August nur den Nährwert von schlechtem Stroh, Kiefernnadeln dagegen eine höhere Verdaulichkeit als Kleie. Wenn man bedenkt, daß auch die Verdauung von Blättern und Nadeln hinsichtlich der hier hauptsächlich in Betracht kommenden Rohfaser wesentlich das Werk von Bakterien ist, so tritt die Bedeutung dieser Lehmannschen Zahlen für unsere Fragestellung hervor. Wir haben daher vergleichende Denitrifikationsversuche mit Augustbuchenlaub und Fichtennadeln angestellt und die Zusätze zu Erde so bemessen, daß als Buchenlaub und Nadeln gleiche Rohfasermengen gegeben wurden.

Die verwendete Erde bestand aus 4 Teilen unseres Versuchsfeldlehmbodens und 1 Teil Sand. In 100 g dieses Gemisches waren enthalten 119,54 mg Gesamtstickstoff und 3,5 mg Nitratstickstoff, berechnet auf trockenen Boden. Auf 1 kg Boden von 7,809 Proz. Wassergehalt wurde dann 1 g $NaNO_3$ zugesetzt entsprechend 17,898 mg N pro 100 g trockener Erde. Es wurden vier Versuche nach folgendem Schema angesetzt:

No. I. 1 kg Erde ohne Zusatz.
„ II. 1 kg „ + 1 g $NaNO_3$,
„ III. 1 kg „ + 1 g „ + 54,2 g Buchenlaub.
„ IV. 1 kg „ + 1 g „ + 40 g Fichtennadeln.

Die Zusätze von Buchenlaub und Fichtennadeln entsprechen je 12,8 g Rohfaser. Da Böden, die reicher an organischer Substanz sind, wie unsere lehmige Versuchsfeldackerkrume, auch ein weit höheres Wasserhaltungsvermögen besitzen wie diese und dementsprechend Mistbeeterde und Waldhumus erst bei einem mehr als doppelt so hohen Wassergehalt zu schmieren anfängt, wie unsere Felderde, so erschien es nicht angängig, die in unserem vorliegenden Versuch mit Buchenlaub und Fichtennadeln versetzten Proben auf demselben Wassergehalt zu halten wie die anderen. Es wurde vielmehr Probe I und II ein Wassergehalt von 16 Proz., Probe III und IV ein solcher von 23,24 Proz. gegeben. Die in Glasgefäßen befindlichen Bodenproben wurden bei 25° gehalten und enthielten Milligramm Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde:

	Anfangs	Nach 50 Tagen		Feuchtigkeit am Schluß in %
I	3,5	4,64 4,64	4,64 Mittel	15,77
II	21,398	22,09 22,25	22,17 „	16,24
III	21,398	0,0 0,0	0,0 „	23,21
IV	21,398	1,21 1,33	1,27 „	23,85

Zwischen Buchenlaub und Fichtennadeln ist also kein wesentlicher Unterschied, beide haben genügend Energie zur Umwandlung des ganzen vorhandenen Nitrates geliefert. Es ist aber nicht aus diesem Versuche zu ersehen, ob Laub oder Nadeln zur schnelleren Denitrifikation Veranlassung gaben. Immerhin ist es möglich, daß die Nadeln schon früher das ganze vorhandene Nitrat zur Umwandlung gebracht hatten und das in Versuch IV gefundene Nitrat sich schon wieder neu gebildet hatte. Es scheint allerdings, als ob das Buchenlaub schneller denitrifiziert habe, weil in Versuch III gar kein Nitrat mehr gefunden wurde. Da aber in Versuch IV nur 1 mg Nitratstickstoff noch vorhanden war, ist der Unterschied zwischen Laub und Nadeln jedenfalls sehr gering. Es wurde daher zu Versuch III und IV neues Natriumnitrat zugesetzt und nach 2 Wochen wieder der Nitratstickstoff bestimmt, um zu prüfen, ob Laub oder Nadeln vielleicht noch weiter denitrifizierten und darin sich eine langsamere Zersetzlichkeit einer der beiden Zusätze sich ausprägte.

Milligramm Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde.

Versuch	Anfangs	Zusatz	Summe	Nach 14 Tagen wiedergefunden	
III. Buchenlaub . . .	0	29,0	29,0	22,395 22,795	22,595
IV. Nadeln	1,27	30,0	31,27	31,445 31,87	31,66

Also trat auf Kosten von Laub noch Denitrifikation ein, auf Kosten der Nadeln nicht mehr, also folglich waren letztere schon vollständig zersetzt, Laub noch nicht, letzteres zersetzt sich also hiernach langsamer.

Eine Wiederholung dieses Versuches wurde mit einem Boden angestellt, welcher enthielt:

120,27 mg Gesamtstickstoff } in 100 g trockenem Boden.
1,6 mg Nitratstickstoff }

Im übrigen war die Einrichtung des Versuches dieselbe wie vorher. Das Resultat war folgendes:

Milligramm Nitratstickstoff in 100 g trockenem Boden.

No.	Anfangs	Nach 3 Wochen	Nach 5 Wochen
I	1,60	3,965	4,11
II	19,79	21,80	20,89
III	19,79	0,62	0,60
IV	19,79	6,08	3,29

Hier scheinen die Nadeln (IV) nach 3 und 5 Wochen noch zu denitrifizieren, das Laub schon nach 3 Wochen nicht mehr, was auf eine schnellere Zersetzung des Laubes gegenüber der der Nadeln schließen läßt. Die Resultate dieser drei Versuche zusammen genommen sind also nicht eindeutig, immerhin zeigt sich aber deutlich, daß hier kein so großer Unterschied zwischen Laub und Nadeln hervortritt, wie in Lehmanns Verdauungsversuchen. Dementsprechend ist auch nicht anzunehmen, daß es im Nadelwald deshalb schlechter wächst wie im Buchenwald, weil die Nadeln entsprechend ihrer höheren Verdaulichkeit zu einer umfassenderen und schnelleren Umwandlung des Nitrates im Waldhumus Veranlassung geben wie das Buchenlaub.

Einige Versuche wurden auch über die Wirkung der mehrfach erwähnten Zusätze auf die Salpeterumwandlung im Boden angestellt. Verwendet wurde ein Gemisch aus 4 Teilen Versuchsfeldboden und 1 Teil Sand, welches in 100 g trockenem Boden 112,79 mg Gesamtstickstoff und 3,71 mg Nitratstickstoff enthielt. Zugesetzt wurden 17,88 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde als Natriumnitrat, so daß das Bodengemisch dann im ganzen 21,59 mg Nitratstickstoff in 100 g trockenem Boden enthielt. Als Energiequelle für die denitrifizierenden Bakterien wurden pro Kilogramm feuchter Erde 2 Proz. Rohrzucker zugesetzt und die Gemische zu je 2 kg in Glasflaschen gefüllt und auf 18 Proz. Feuchtigkeit bei 25° gehalten. Die nach 25 Tagen vorgenommene Nitratstickstoffbestimmung ergab, daß die Zusätze von ätherischen

Ölen, Tannin usw. kaum retardierenden Einfluß auf die Salpeterumwandlung gehabt hatten. Dieser Prozeß verläuft bei Gegenwart von Zucker offenbar so heftig und wird von so vielen und verschiedenartigen Bakterien des Bodens bewirkt, daß die bei anderen bisher von uns untersuchten physiologischen Prozessen wirksamen Gifte hier machtlos sind. Die Resultate dieser Reihe, ausgedrückt in Milligramm Nitratstickstoff pro 100 g trockenem Boden, sind folgende. In dem Versuch ohne Zusatz war wohl schon wieder neues Nitrat aus dem zunächst aus dem Nitrat gebildeten Bakterieneiweiß entstanden. Demnach würde durch die gegebenen Zusätze der Prozeß der Bakterieneiweißbildung und seine Umkehrung doch etwas retardiert sein.

Ohne Zusatz	5 ccm Carven	5 ccm Edeltannennadelöl	5 ccm Terpentin	10 ccm Terpentin	$5^0/_{00}$ Ameisensäure
2,7	0,5	0,8	1,1	0,6	1,3

80 g Nadeln	Kolophonium 2%	1% Tannin	10% Tannin
0,6	0,4	0,6	0,7

Da die Zellulose als Energiequelle bei der Salpeterumwandlung im Boden und bei der Stickstoffbindung durch Bodenbakterien ausgezeichnet brauchbar ist, war es von besonderem Interesse, die Beeinflussung der mikrobiologischen Zellulosezersetzung im Boden durch die von uns untersuchten Stoffe zu prüfen. Je 2 kg des mehrfach erwähnten Bodengemisches wurden mit je 20 g in Quadratzentimeter große Stückchen geschnittenen Filtrierpapiers versetzt und in Glasflaschen bei 25° gehalten. Nach 175 Tagen wurde das Papier abgesiebt und von den anhängenden Erdteilchen möglichst gereinigt, getrocknet und gewogen. Der von den 20 g Papier übriggebliebene Rest ist in Gramm in folgender Tabelle verzeichnet:

Ohne Zusatz	5 ccm Carven	5 ccm Edeltannennadelöl	5 ccm Terpentin	10 ccm Terpentin	$5^0/_{00}$ Ameisensäure
0,3	1,6	13,7	7,4	15,2	3,4

80 g Nadeln	2% Kolophonium	1% Tannin	10% Tannin
13,8	12,4	13,7	18,0

Ganz unzweifelhaft zeigt sich hier ein sehr erheblich verlangsamender Einfluß der meisten Zusätze auf die Zellulosezersetzung; kaum hat nur Carven, wenig die Ameisensäure gewirkt. Durch diese Konservierung der Zellulose, welche als Energiematerial bei der Salpeterumwandlung schädlich auf das Pflanzenwachstum im Boden wirkt, beeinflussen wohl sicher die Stoffwechselprodukte der Nadelhölzer die Pflanzenentwicklung ungünstig. Zu dieser Zellulosezersetzungsreihe ist noch einiges nachzutragen. Die zugesetzten Nadeln haben zum Teil wohl dadurch konservierend auf die Zellulose, welche als Papier zugefügt wurde, gewirkt, daß die Zellulose der Nadeln leichter angegriffen wurde, wie die des Papiers, wenigstens schien ein wesentlicher Teil der Nadeln am Schlusse des Versuches verschwunden zu sein. Daß die Nadeln im Boden durch niedere Organismen leicht angegriffen werden, beweisen ja auch unsere oben erwähnten Denitrifikationsversuche.

Auffallend ist die hier ebenso wie oben bei den Nitrifikationsversuchen und denen über Alkoholgärung hervortretende bakterienfeindliche Wirkung des Kolophoniums, welche übereinstimmt mit der orientalischen Anwendung des Koniferenharzes zur Konservierung des Weines, welche oben schon angeführt wurde. Der Einfluß des Harzes auf die Haltbarkeit des Weines ist indessen wegen der dort vorliegenden harzlösenden Wirkung des Alkohols verständlicher als die Hemmung der Bakterientätigkeit im Boden durch Harz, wo die Bedingungen der Lösung dieses Zusatzes jedenfalls nicht günstige sind.

Die beschriebenen Zelluloseversuche sind besonders geeignet, die Giftwirkung der Koniferenstoffwechselprodukte gegenüber Bakterien und ähnlichen niederen Organismen zu demonstrieren, wenn man die Papierreste aus den einzelnen Versuchen in gleich große Gläser gefüllt nebeneinander stellt. Die beträchtlichen Unterschiede in der Menge des zurückgewonnenen Papieres treten dann sehr schön hervor.

Ebenso wie bei der Salpeterbildung ist aber auch hier zu betonen, daß diese Konservierung der Zellulose nicht das geringere Wachstum des Buchweizens in den von mir verwendeten Harzer Fichtenbodendecken erklären kann. Denn dieser Humus enthielt ja viel Salpeter; die für Denitrifikation als Energiequelle verwendbare Zellulose oder ähnliche Körper müssen also schon zersetzt sein oder die Salpeterbildung muß gegenüber der Denitrifikation überwiegen, weil die vorhandene Zellulose sich zu langsam zersetzt. In salpeterfrei befundenem Waldhumus kann aber das hier betonte Moment eine Rolle spielen. Und als Mittel, um die Giftwirkung der Koniferenstoffwechselprodukte im allgemeinen zu demonstrieren, haben diese Zelluloseversuche auch hinsichtlich unserer Harzer Fichtenhumusproben Bedeutung.

Wenn man die Resultate der vorstehenden Versuche in ihrer Gesamtheit überblickt, so dürfte die Giftwirkung der meisten untersuchten Koniferenstoffwechselprodukte auf höhere Pflanzen, Hefen und Bakterien klar hervortreten. Außer anderen Gründen wird auch diese Giftwirkung mit dazu beitragen, daß die Bodendecke der Fichtenwälder im Gegensatz zu der der Buchenwälder ungünstig auf das Pflanzenwachstum wirkt.

Ehrenberg und Bahr haben vorliegende Arbeit schon vor ihrer Publikation auf Grund eines von mir in der chemischen Gesellschaft in Göttingen über das gleiche Thema gehaltenen Vortrages kritisiert (Journal f. Landwirtschaft 1913). Sie haben selbst beobachtet, daß Buchweizen durch Fichtenhumus sowohl wie durch Buchenhumus, der zu kalkarmem Sandboden zugesetzt war, stark geschädigt wurde und diese Schädigung in kalkhaltigem Lehmboden wie nach Kalkdüngung des Sandbodens ausblieb. Ehrenberg und Bahr glauben diese Schädigung auf die saure Reaktion ihrer Humussorten zurückführen zu sollen; der Kalk soll durch Neutralisation der Humussäuren diese Schädigung aufgehoben haben. Mit meinen Versuchen sind demnach diejenigen von Ehrenberg und Bahr gar nicht zu vergleichen, weil bei den genannten Autoren auch der Buchenhumus giftig wirkte, während es sich für mich darum handelte, zu erklären, warum in der von mir benutzten Fichtenhumusprobe die Pflanzen schlechter wuchsen, wie in meiner Buchenhumussorte.

Die Heranziehung der Giftwirkung ätherischer Öle usw. zur Erklärung der in Rede stehenden Beobachtungen ist nach Ehrenberg und Bahr nicht begründet. Sie glauben, daß vielmehr Wasser- und Lichtverhältnisse genügen dürften, um das verschiedene Gedeihen von Pflanzen im Humus der

Buchen- und Nadelwälder zu erklären. Daß diese Umstände aber bei meinen so verschiedene Pflanzenentwicklung zeigenden Topfversuchen nicht in Frage kommen können, habe ich oben schon betont. Nach Ehrenberg und Bahr spricht gegen eine Bodenvergiftung durch Nadelwaldhumus auch die Beobachtung, daß nach einem Kahlschlag die vom Nadelwald geräumte Fläche sich sehr bald mit allerlei Gräsern und anderweitigen Pflanzen überzieht. Ich glaube, daß diese Erfahrungstatsache darauf zurückzuführen ist, daß die Pflanzen verschieden empfindlich gegen die Gifte des Nadelwaldhumus sind und vorwiegend wenig empfindliche Pflanzen sich auf den Kahlschlägen einstellen.

Unverständlich ist mir die Bemerkung von Ehrenberg und Bahr geblieben, daß mit der Annahme einer Bodenvergiftung das Unterbauen von Nadelholz mit anderen Holzgewächsen oder Erziehung von Mischwald äußerst schwer vereinbar sei. Im Gegenteil muß doch ein Untermischen des Nadelwaldhumus mit dem von Laubhölzern produzierten die in ersterem vermuteten Gifte gewissermaßen verdünnen und dadurch günstig wirken.

Und wenn man überhaupt die Meinung vertreten will, daß die Begrünung der Kahlschläge und die Erziehung von Mischwald unvereinbar sei mit der Annahme einer Giftwirkung des Bodens, so würden diese Einwände in beiden Fällen zu erheben sein, ganz gleichgültig, ob man diese Giftwirkung auf Humussäuren oder auf ätherische Öle und andere Stoffwechselprodukte zurückführen will.

Herrn Dr. Wichers danke ich bestens für die sorgfältige Ausführung der für diese Arbeit nötigen Analysen. Ebenso danke ich der deutschen Landwirtschaftsgesellschaft vielmals für die finanzielle Unterstützung dieser Untersuchungen.

Literatur.

Bouchardat, Sur le ferment saccharine ou glucosique. (Ann. chim. phys. T. 14. p. 61.)

Borchardt, Ludwig, Die Dienerstatuen aus den Gräbern des alten Reiches. (Zeitschr. f. ägypt. Sprache u. Altertumsk. Bd. 35. p. 119.)

Bokorny, Th., Über die Wirkung der ätherischen Öle auf Pilze. (Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 73. 1899. p. 555.)

—, Über die pilzfeindliche Wirkung des Hopfenöles, verglichen mit der Wirkung einiger anderer ätherischer Öle. (Allg. Brauer- u. Hopfen-Ztg. 1898. p. 2999; Kochs Jahresbericht Bd. 9. p. 116.)

Boussingault, Des nitrates dans le sol et dans les eaux. (Agronomie 3. éd. T. 2. 1886. p. 40.)

Cadéac et Meunier, Action antiseptique des essences. (Ann. de l'Instit. Pasteur. 1889. p. 220.)

Coupin, H., Sur la toxicité comparée des essences végétales sur les végétaux supérieurs. (Compt. rend. de l'acad. d. scienc. Paris. T. 152. p. 529.)

Czapek, Biochemie der Pflanzen. Bd. 2. p. 925.

De Candolle, Mém. sur la famille des Ombellifères. 1829. p. 11.

—, Physiologie végétale. 1832. T. 3. p. 1347.

Ehrenberg, P. und Bahr, F., Zur Verwendung von Waldhumus in der Landwirtschaft. (Journal f. Landwirtsch. 1913. p. 325.)

Flügge, Mikroorganismen. I. 1896. p. 473.

Fricke, Licht- und Schattenholzarten, ein wissenschaftlich nicht begründetes Dogma. (Centralbl. f. d. ges. Forstwes. 1904. p. 315.)

Geinitz, R., Vergleichende Versuche über die narkotischen und desinfizierenden Wirkungen der gangbarsten ätherischen Öle und deren wirksame Bestandteile. (Sitz.-Ber. u. Abh. d. naturf. Gesellsch. Rostock. [2]. 4; Chem. Centralbl. 1912. II. p. 135.)

Gilmour, Antiseptic and other properties of essential oils. (Pharm. Journal and Pharmacist. Vol. 84. p. 644.)

Göppert, De acidi hydrocyan. in plantis comm. Breslau 1827.
Heller, Über die Wirkung ätherischer Öle und einiger verwandter Körper auf die Pflanze. [Diss. phil.] Leipzig 1903; (Flora. Bd. 93).
Kautz, Schutzwald. Berlin [Springer] 1912.
Kobert, K., Über die antiseptische Wirkung terpenhaltiger und terpenfreier ätherischer Öle. (Pharm. Post. Bd. 40. p. 627.)
Lehmann, **Fr.**, Protokoll der Gesamtsitzung der Landwirtschaftskammer. Hannover 21.—23. Januar 1908. (Hannov. land- u. forstw. Ztg. 1893. u. 1894)
Lévy, L., Über den Gebrauch von Harz (résinose) bei der Brennerei. (Bull. de l'assoc. des chimistes de sucr. et distill. T. 28. p. 195; Chem. Centralbl. 1910. II. p. 1511.)
Martindale, H., Antiseptical effect of ethereous oils. (Pharm. Journal a. Pharmacist. Vol. 85. p. 668; Chem. Centralbl. 1911. I. p. 171.)
Meyer, H. und **Gottlieb**, R., Pharmakologie. II. Aufl.
Migula, Nitrifikation im Waldboden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 5. p. 365.)
Müller, P. E., Humusformen.
Nobbe, und **Hänlein**, Die landw. Versuchsstat. Bd. 21. 1878. p. 437.)
Ramm, S., Die waldbauliche Zukunft des württembergischen Schwarzwaldes. (Staatswiss. Diss.] Tübingen 1911.
Reutter, Compt. rend. de l'acad. Paris. T. 154. p. 1658.
Riedlin, Versuche über die antiseptische Wirkung des Jodoforms, der ätherischen Öle und einiger anderer Substanzen. [Diss.] München 1887.
Schmidt, W. A., Chemische und biologische Untersuchungen von ägyptischen Mumienmaterial nebst Betrachtungen über das Einbalsamierungsverfahren der alten Ägypter. (Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. 7. 1907.)
Schulz, **Konrad**, Die Verbreitung der Bakterien im Waldboden. [Diss.] Jena 1913. 8⁰.
Schübler, Untersuchungen über die Einwirkung verschiedener Stoffe auf die Pflanze. (Flora. 1827. p. 753.)
Stahl, E., Pflanzen und Schnecken. (Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 22. 1889.)
Tschirch, A., Über im ersten Jahrhundert v. Chr. bei der Einbalsamierung der Leichen in Ägypten und Karthago benutzten Harze. (Arch. d. Pharm. Bd. 250. p. 170; Chem. Centralbl. 1912. II. p. 40.)
Weis, Über Vorkommen und Bildung der Salpetersäure in Wald- und Heideboden. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 28. p. 434.)
Wolff, Giftigkeit von Terpentinöl usw. (Farben-Ztg. Bd. 17. p. 1495.)

Tafelerklärung.

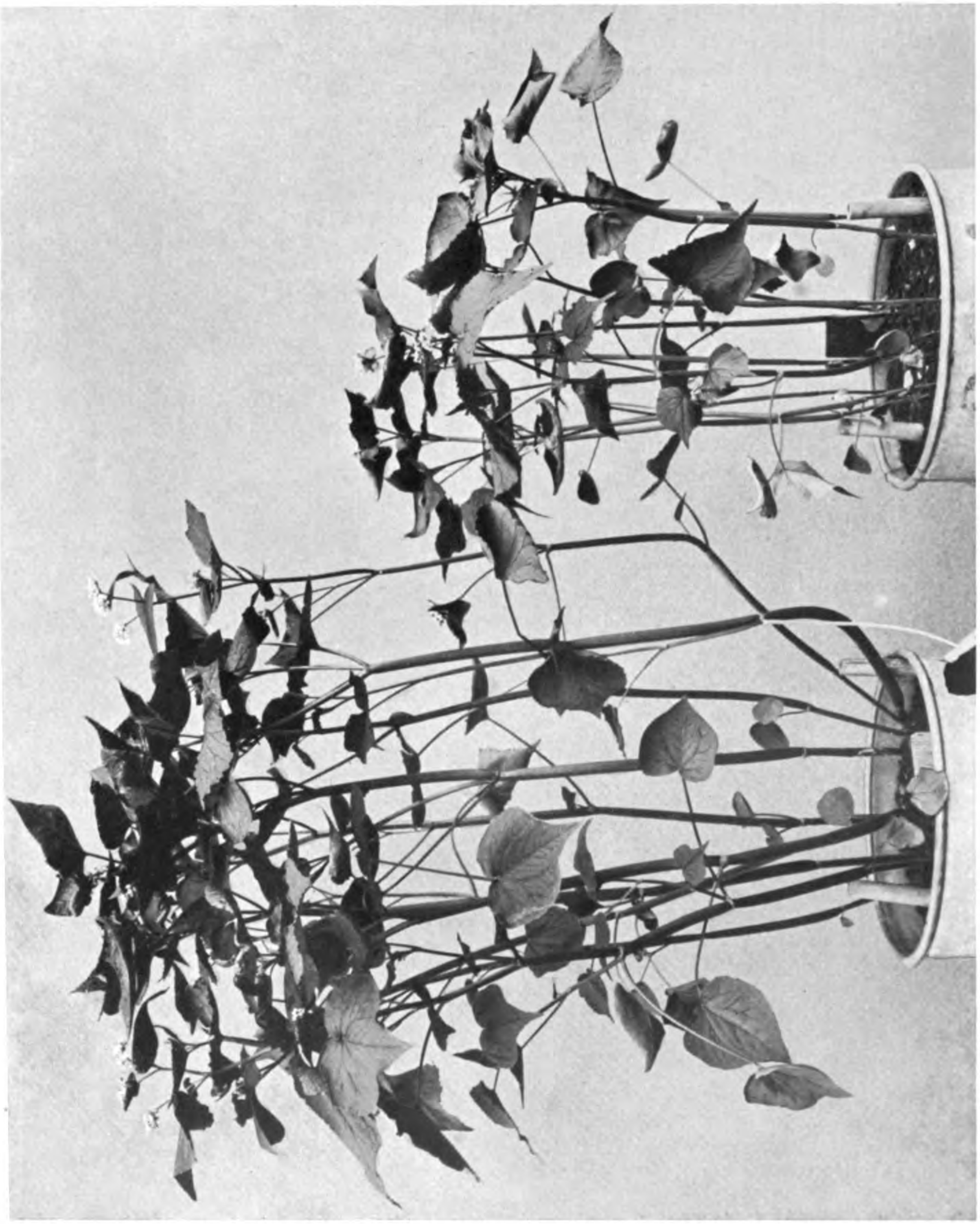
Tafel 1. Buchweizen in Buchen- und Fichtenhumus der Oberförsterei Sieber. Im Fichtenhumus ist der Buchweizen viel schwächer entwickelt.

Tafel 2. Impatiens Sultanii durch Terpentindampf getötet.

Tafel 3. Rapskeimpflanzen, etwas geschädigt durch Terpentindampf, stärker durch Carvendampf.

Kressekeimpflanzen, getötet durch Terpentindampf, geschädigt durch Carven.

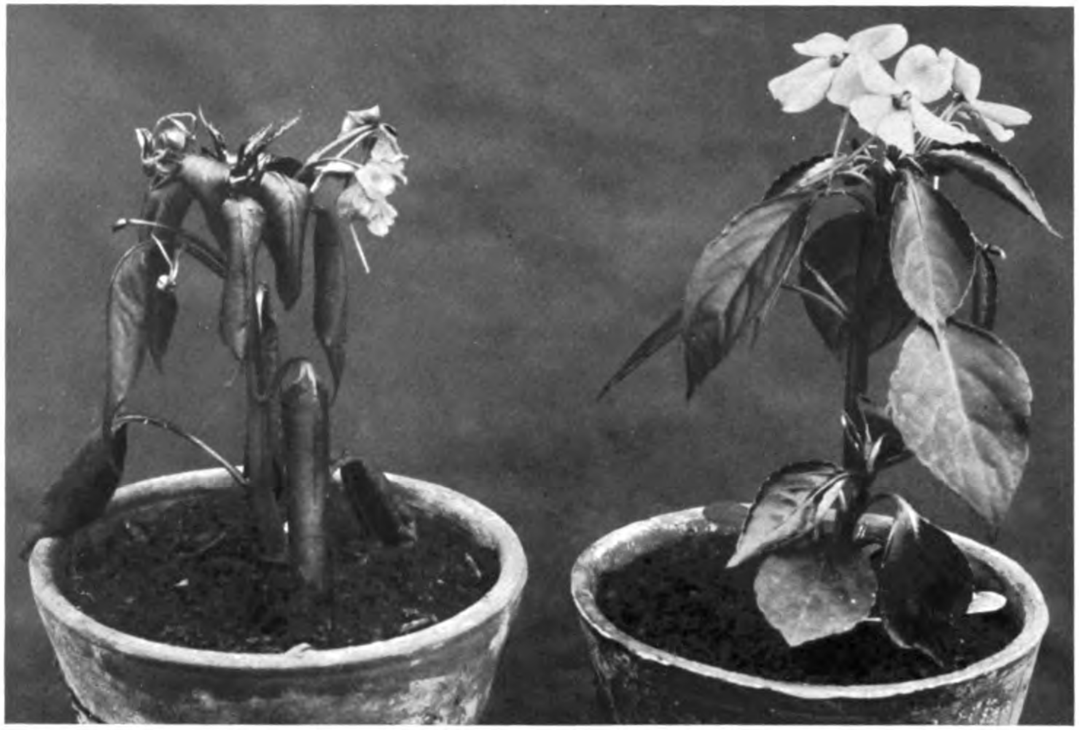
Tafel 4. Mais, geschädigt durch Zusatz von Fichtennadeln zur Erde.



Buchenhumus Fichtenhumus

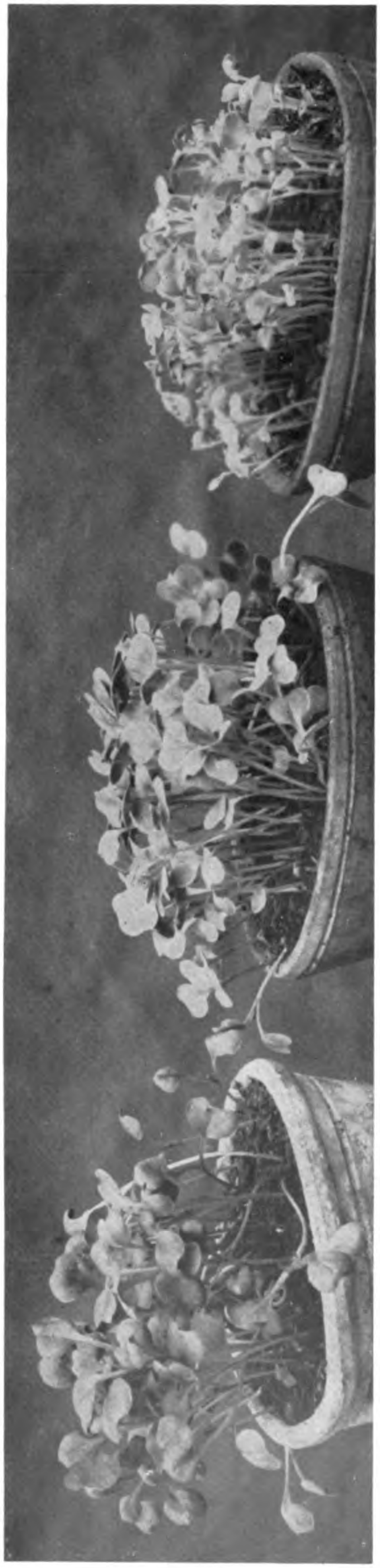
aus der Oberförsterei Sieber

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**



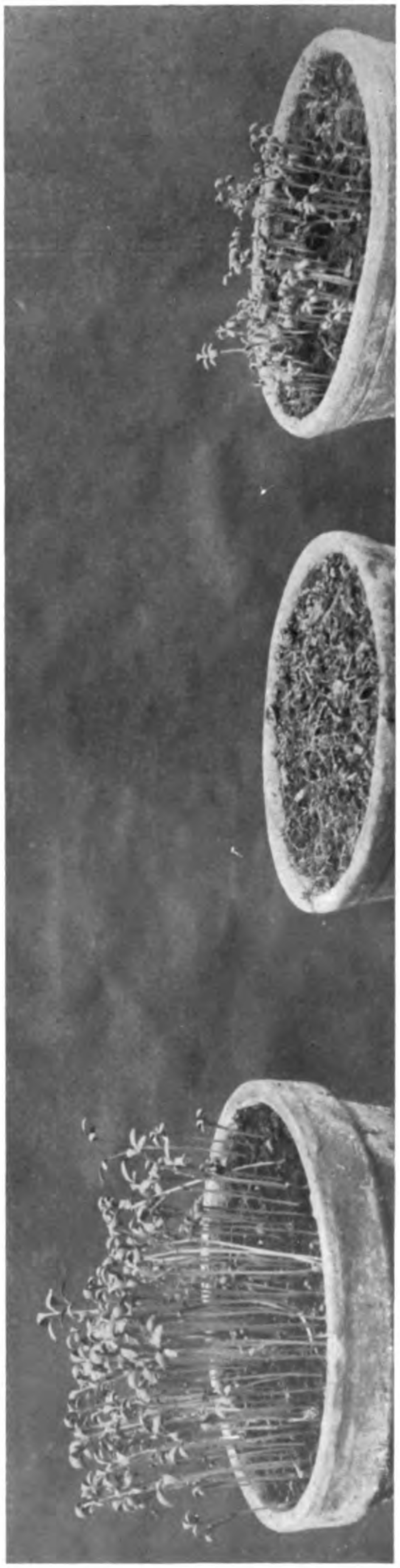
Links Impatiens Sultanii 24 Stunden im Terpentindampf unter einer Glocke, rechts ohne Terpentin.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**



Unbehandelt Terpentindampf Carvendampf

Rapskeimpflanzen unter Glocken. Mai 1912.



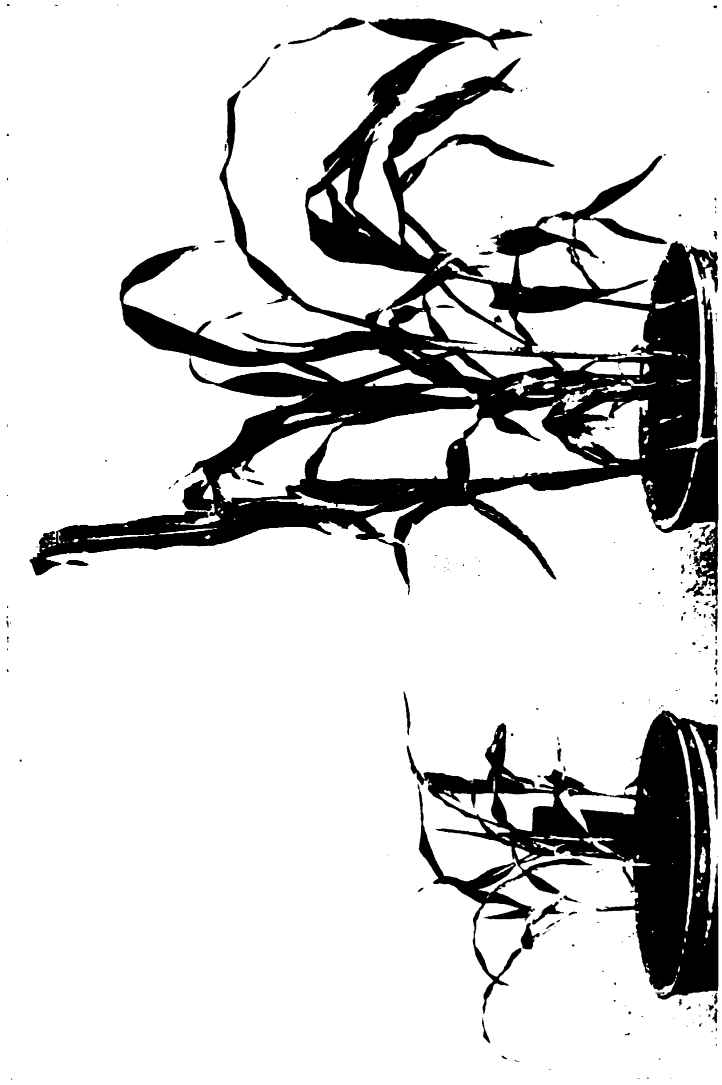
Unbehandelt Terpentin Carven

Kressekeimpflanzen unter Glocken. Mai 1912.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Centralblatt für Bakteriologie Abt. II. Bd. 41.

***Koch,** Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes Taf. IV.*



200 g Fichtennadeln pro 5 kg Erde

Unbehandelt

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Nachdruck verboten.

Einige Beobachtungen über Stickstoff-Bindung durch Azotobacter in stickstoffarmen und in stickstoffreichen Substraten.

[Aus dem Bakteriologischen Laboratorium des Landwirtschaftlichen Instituts der Universität Leipzig.]

Von **J. Hanzawa,** Sapporo.

Bei einigen im vorigen Jahre von H. H. Green im hiesigen Laboratorium durchgeführten Untersuchungen hatte sich die bemerkenswerte Tatsache herausgestellt, daß Mischkulturen verschiedener Azotobacter-Stämme sowohl in der wäßrigen Mannitlösung wie im Mannit-Erdextrakt weit größere Stickstoffernten lieferten, als unter gleichen Bedingungen von den einzelnen Reinkulturen in der Regel erlangt werden können. Pro 100 ccm 2-proz. Mannitlösung wurden durch die Mischkulturen an Stickstoff fixiert[1]):

in Mannit-Leitungswasser	5,6 mg
in Mannit-Erdextrakt	14,2 „

Einige weitere Versuche in dieser Richtung schienen am Platze zu sein. Da ferner aus den von Herrn Green angestellten und a. a. O. besprochenen Humusversuchen noch mehrere Gramm Stalldünger- und Gründüngerhumus vorhanden waren, brachte ich auf Vorschlag des Herrn Prof. Löhnis einige Experimente in Gang, die zeigen sollten, in welcher Weise der Stickstoffgehalt des Substrates auf die Stickstoffbindung durch Azotobacter einwirken kann. Ein Versuch über die Tauglichkeit des Humus als Energiequelle im Stickstoffixierungsprozeß schloß sich an.

1. Stickstoffbindung durch Rein- und durch Mischkulturen.

Dieselben 4 Azotobacter-Stämme, die zu den früheren Versuchen benutzt worden waren, wurden in ungefähr gleichen Mengen einzeln und gemischt in je 50 ccm Mannitlösung geimpft, die sich in 300 ccm Erlenmeyer-Kolben befanden. In der einen Reihe diente als Lösungsmittel Leitungswasser, in der anderen Erdextrakt; in beiden Fällen wurden 2 Proz. Mannit, 0,05 Proz. K_2HPO_4 und etwas Kreide zugegeben. Nach 3-wöchiger Versuchsdauer (bei 20° C) wurden die in Tabelle 1 zusammengestellten Resultate erlangt.

Die Mischkulturen haben demnach in der Tat zusammen entschieden kräftiger gearbeitet als einzeln. Das in der wäßrigen Lösung erzielte Ergebnis, 3,55 mg pro 50 ccm, entspricht demjenigen H. Greens (5,6 mg pro 100 ccm). Dagegen blieb die Stickstoffixierung im Mannit-Bodenextrakt diesmal wesentlich zurück. Immerhin steht aber auch hier die Mischkultur noch deutlich an der Spitze.

2. Stickstoffbindung in stickstoffarmen und in stickstoffreichen Substraten.

Daß die mehrfach geäußerte Ansicht, ein größerer Stickstoffvorrat im Boden hemme die Stickstoffbindung, nicht ohne weiteres als zutreffend hingenommen werden kann, ist bereits durch eine ganze Reihe von Versuchen erwiesen worden. Wie bei der Nitrifikation die organische Substanz des Bodens in der Regel eher förderlich als nachteilig wirkt, weil sie nur zu einem geringen Anteile löslich ist, so durfte auch vermutet werden, daß der schwer lösliche Humusstickstoff die Stickstoffbindung nicht schädigen würde. Dagegen war vom Salpeter das Gegenteil zu erwarten.

---

[1]) Löhnis und Green, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 40. 1914. p. 58.

Tabelle 1.

Kultur	Lösung	Kolben No.	Vorlage ccm	Rück-titr. ccm	Gebd. Säure = mg N	Pro 50 ccm mg N (Mittel)	gegen steril
Azobacter Beijerinckii	Wasser	1	10	9,2	0,8	0,8	—
		2	10	9,2	0,8		
	Boden-extrakt	3	10	8,3	1,7	1,7	0,25
		4	10	8,3	1,7		
Az. vinelandii	Wasser	5	10	7,55	2,45	2,0	1,0
		6	10	8,45	1,55		
	Boden-extrakt	7	15	12,1	2,9	3,4	1,95
		8	15	11,1	3,9		
Az. vitreum	Wasser	9	10	8,8	1,2	1,15	0,15
		10	10	9,1	0,9		
	Boden-extrakt	11	10	8,0	2,0	2,0	2,05
		12	10	8,0	2,0		
Az. chroococcum	Wasser	13	10	8,9	1,1	1,2	0,2
		14	10	8,7	1,3		
	Boden-extrakt	15	10	7,1	2,9	3,5	2,05
		16	10	5,9	4,1		
Mischkultur (von Az. Beijerinckii, vinelandii, vitreum und chroococcum)	Wasser	17	15	10,1	4,9	4,55	3,5
		18	10	5,8	4,2		
	Boden-extrakt	19	15	11,0	4,0	4,15	2,70
		20	15	10,7	4,3		
Kontrolle (steril)	Wasser	21	10	9,0	1,0	1,0	—
		22	10	9,0	1,0		
	Boden-extrakt	23	10	8,6	1,4	1,45	—
		24	10	8,5	1,5		

Je 1 ccm einer Mischkultur der vier Azotobacter-Stämme wurde in je 50 ccm 2-proz. Mannit-Bodenextrakt (in 300 ccm-Erlenmeyer-Kolben) eingeimpft, dem vor der Sterilisation etwas Kreide und verschiedene Mengen von Humus (aus Stalldünger) resp. Salpeter zugesetzt worden waren. In der Salpeterreihe erhielt jeder Kolben 0,05 g Humus. Nachdem die Versuche 3 Wochen bei 20° C gestanden hatten, wurden die Lösungen, soweit sie Salpeter enthielten oder enthalten hatten, nach Ulsch reduziert und dann sämtlich nach Kjeldahl verbrannt und destilliert. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse.

In der Humusreihe hat durchweg eine sehr kräftige Stickstoffbindung stattgefunden, und zwar ist die höchste Ernte dort erzielt worden, wo die größte Humusmenge zugesetzt worden war. Der Stickstoffgehalt im sterilen Substrat war hier ca. 5 Proz. des Kohlenstoffvorrates.

Ganz anders verhält sich die Salpeterreihe. Die kleinen Gaben haben zwar noch nicht deutlich hemmend gewirkt. Doch hört dann, wenn an

Stickstoff mehr als 2,5 Proz. des Kohlenstoffgehaltes vorhanden ist, die Fixierung des elementaren Stickstoffes auf. In den Kolben No. 19—21 waren auf je 100 Teile Kohlenstoff annähernd 10 Teile Stickstoff zugegen.

Tabelle 2.

Substanz		geimpft oder steril	Kolben No.	Vorlage ccm	Rück-titr. ccm	Gebd. Säure = mg N	Pro 50 ccm mg N (Mittel)	gegen steril
Stalldünger-Humus	0,1 g	geimpft	1	20	3,7	16,3	16,7	10,1
		geimpft	2	20	2,9	17,1		
		steril	3	20	13,4	6,6		
	0,3 g	geimpft	4	30	3,4	26,6	2,66	11,7
		geimpft	5	30	3,4	26,6		
		steril	6	30	15,1	14,9		
	1,5 g	geimpft	7	80	2,6	77,4	75,8	11,4
		geimpft	8	80	5,6	74,2		
		steril	9	80	15,6	64,4		
	3,0 g	geimpft	10	140	6,7	131,1	134,2	23,9
		geimpft	11	140	4,7	135,3		
		steril	12	140	29,7	110,3		
Salpeter	0,012 g	geimpft	13	20	8,0	12,0	12,05	5,25
		geimpft	14	20	7,9	12,1		
		steril	15	20	13,2	6,8		
	0,06 g	geimpft	16	30	9,6	20,4	18,45	5,35
		geimpft	17	30	13,5	16,5		
		steril	18	30	16,9	13,1		
	0,3 g	geimpft	19	80	39,2	40,8	40,2	—
		geimpft	20	80	40,4	39,6		
		steril	21	80	39,4	40,6		

Aus diesen Versuchen läßt sich schließen, daß der Humusstickstoff im natürlichen Boden kaum jemals nachteilig auf die Stickstoffbindung einwirken wird. Und auch vom Salpeter finden sich wohl nie so große Mengen in der Ackererde vor, daß hieraus eine Schädigung resultieren könnte.

3. Humus als Energiequelle im Stickstoffixierungsprozeß.

Die ungewöhnlich hohen Stickstoffernten in denjenigen Kolben, die 3 g Stalldüngerhumus enthielten, legten die Vermutung nahe, daß der Humus hier zugleich als Energiequelle fungiert hatte. Die mit 1,5 g Humus erhaltenen Resultate wollen allerdings nicht recht hierzu stimmen. Es ist indessen sehr wohl möglich, daß die Stickstoffzahl für den sterilen Kolben etwas zu hoch ist. Der Berechnung nach sollten ca. 56 mg Stickstoff vorhanden sein. Danach würde sich ein entsprechender Mehrertrag herausgestellt haben.

Jedenfalls schien es geboten, diese Frage noch etwas näher zu verfolgen. Da aber der Vorrat an Stalldüngerhumus fast erschöpft war, konnte nur noch ein Versuch in Gang gebracht werden. Vergleichsweise wurde ein zweiter Kolben mit 3 g Gründüngerhumus beschickt.

Die Lösung bestand diesmal nur aus Leitungswasser + 0,05 Proz. K_2HPO_4. Zur Impfung diente wieder 1 ccm der Azotobacter-Mischkultur. Nach mehrtägiger Aufbewahrung war zwar mikroskopisch ein relativ kräftiges Wachstum der eingeimpften Organismen erkennbar, doch blieb es makroskopisch so gering, daß es zweckmäßig erschien, die Stickstoffbindung durch eine kleine Beigabe von Mannit zunächst erst einmal richtig in Gang zu bringen. Auf je 50 ccm Lösung wurde 1 ccm einer 10-proz. sterilisierten Mannitlösung (= 0,1 Proz.) zugegeben, der Sicherheit halber wurden die Kolben dann nochmals sterilisiert und von neuem geimpft. Nach 3 Wochen (bei 20° C) wurde der Stickstoff bestimmt. Es fanden sich in je 50 ccm Lösung:

	steril	geimpft	Zunahme
mit Stalldünger-Humus	110,3 mg	126,6 mg	16,3 mg
„ Gründünger-Humus	133,2 „	136,8 „	2,6 „

Nimmt man die denkbar günstigste Verwertung des zugegebenen Mannits an, so war ein Stickstoffgewinn von ca. 2 mg zu erwarten. Dem entspricht der Befund bei Verwendung von Gründüngerhumus. Der Stalldüngerhumus hat dagegen wiederum die Stickstoffzahl so stark erhöht, daß kaum mehr bezweifelt werden kann, daß er selbst als Energiequelle im Stickstofffixierungsprozeß tatsächlich fungiert hat.

Leider waren die Humusvorräte und auch die für diese Versuche zur Verfügung stehende Zeit erschöpft, so daß eine Fortführung derselben vorerst nicht möglich war. Jedenfalls ist die hier berührte Frage aber interessant genug, um auf sie zwecks eingehenderer Bearbeitung hinzuweisen.

Zusammenfassung.

1. Mischkulturen verschiedener Azotobacter-Stämme wirkten kräftiger Stickstoffixierend als die betreffenden Reinkulturen. Namentlich in wäßriger Mannitlösung wurde der Effekt bedeutend erhöht.

2. Humusstickstoff übte, auch in großen Quantitäten, keinen nachteiligen Einfluß auf die durch Azotobacter-Reinkulturen veranlaßte Stickstoffbindung aus. Salpeterstickstoff blieb, in kleineren Mengen verwandt, fast ohne Einfluß, in größeren Gaben, d. h. wenn auf je 100 Teile Kohlenstoff mehr als 2,5 Teile Stickstoff vorhanden waren, trat deutliche Hemmung ein, die schließlich zum Stillstande führte. Diese Versuche sprechen dafür, daß der Stickstoffvorrat im natürlichen Boden, wenn überhaupt, nur in sehr seltenen Ausnahmefällen die Stickstoffbindung nachteilig beeinflussen wird.

3. Manche Humusstoffe scheinen als Energiequelle im Stickstoffixierungsprozeß fungieren zu können, anderen geht diese Fähigkeit ab. Stalldüngerhumus zeigte positive, Gründüngerhumus negative Eigenschaften.

Nachdruck verboten.

Investigations into the Nitrogen Metabolism of Soil.

[From the Laboratorium für Bakteriologie am landwirtschaftlichen Institut der Universität Leipzig.]

By **H. H. Green**, B. Sc. (Glas.)

I. Introduction.

In 1905 Löhnis[1]) published his "Untersuchungen über den Verlauf der Stickstoffumsetzungen in der Ackererde", and immediately afterwards a condensed summary of that publication appeared in this journal[2]).

So far as I know no similar work has since been carried out, and a continuation and extension was therefore undertaken during the year August 1912 to August 1913. The results form the subject-matter of the present communication. No introductory discussion of literature is considered necessary since the references quoted by Löhnis cover the ground up to the date of his publication and the subsequent work bearing directly or indirectly upon the questions at issue is summarised and discussed in his "Handbuch der landwirtschaftlichen Bakteriologie" (Berlin 1910).

II. Purpose and Scheme of work.

The purpose of the present study may be broadly outlined as an attempt to investigate in certain directions:

1. The influence of the character, and mode of cultivation, of a soil, and of weather and season, upon the activity of the organisms concerned directly or indirectly with certain of the general processes of nitrogen metabolism in soils.

2. The suitability, or otherwise, of certain of the laboratory methods at present in use for the bacteriological study of soil.

3. The relation between the results of laboratory tests and those of experiments in the field. The scheme of work includes:

1. The sampling of selected plots of an experimental soil-area at regular intervals throughout the year, inoculation of the soil so obtained into solutions of specific composition, and the determination, after a given time interval, of the extent of (a) ammonification of calcium cyanamide and of the organic manures flesh meal, horn meal, and blood meal (b) nitrification of ammonium sulphate (c) fixation of atmospheric nitrogen by Azotobacter and other functioning organisms.

2. The parallel determination of ammonification, nitrification, and cyanamide decomposition, by means of laboratory tests carried out in the soil itself as medium; and the comparison of such tests with the corresponding tests in solution.

3. A comparison of laboratory data so obtained with the extent of utilisation of nitrogen by a crop growing over the differentially manured soil area.

4. A comparison of the bacterial activity of the soil, and of the crop returns, on one half of the area in which the wheat stubbles were broken in summer and the soil ploughed in autumn, with the activity and returns from the other half left untouched until the spring cultivation for seed-bed.

---

[1]) Mitt. d. Landwirtsch. Instit. d. Univ. Leipzig. H. 7. p. 1—103.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 15. p. 361—365 a. 430—435.

III. Arrangement of Experiments and Methods of Investigation.

1. Arrangement of laboratory methods[1]). The following summary indicates the conditions of the solution tests:

Process	Duration	Material	Quantity	Mgs N. contained	Medium
Nitrification .	30 days	$(NH_4)_2SO_4$	—	11.2	50 cc. soil extract + $CaCO_3$
N. fixation . .	10 ,,	Mannite	1 gm.	—	100 cc. ,, ,,
Ammonification	10 ,,	Flesh meal	0,4 ,,	26	50 cc. tap-water + $MgHPO_4$
		,, ,,	0,8 ,,	52	,, ,,
,,	10 ,,	Horn meal	0,2 ,,	27	50 cc. ,, ,,
		,, ,,	0,4 ,,	54	,, ,,
,,	20 ,,	Blood meal	0,4 ,,	48	50 cc. ,, ,,
,,	20 ,,	Cyanamide	0,1 ,,	13.5	50 cc. soil extract + 0.01 % glucose + 0.01 % asparagin

The organic manures used were passed through a mill to reduce them to a uniform coarse powder. The cyanamide was repowdered in a mortar. The soil extract was prepared from the soil under investigation and was supplied with 0.05 per cent K_2HPO_4.

The 50 cc. of liquid in the 300 cc. Erlenmeyer flasks used, gave a depth to surface diameter ratio of approximately 1 : 7.

In the soil tests the same quantities of flesh meal, horn meal, and blood meal were used as in solution tests. For Cyanamide 0.1 gm was used in some cases, 0.5 gm in others — of this mention will again be made in the discussion of results.

The mode of carrying out the tests both in soil and in solution, and the methods used in estimating nitrogen, were those described in previous papers (l. c.). In the case of cyanamide, where the possible presence of urea as one decomposition product had to be considered, slight alteration was made. The filtrate from the extracted soil was in this case distilled with magnesia for ammonia, then boiled with caustic soda containing a drop of bromine before proceeding with the estimation of nitrate. The water content in all soil tests amounted to 70 per cent of the water-holding capacity of the soil. For nitrogen-fixation, the nitrogen fixed in soil extract + 1 per cent mannite was determined by the Kjeldahl-Wilfarth method.

In all cases both of soil and solution tests blank controls were carried out in such a way that on deduction of these, data representing, as nearly as feasible, the actual processes of decomposition, were obtained. The tables at the end of the paper represent the analytical data after deducting the controls.

2. Sterilisation and inoculation. In solution tests the media for nitrification, for nitrogen-fixation, and for ammonification of flesh meal, horn meal, and blood meal, were sterilised before inoculation. With the three latter materials flasks were also set up with the unsterilised substrates in the condition in which they are naturally applied to the field. In the case of cyanamide the material was added after sterilisation of the rest of the substrate. Blank tests (without inoculation) showed no appreciable ammonification of the cyanamide. Changes which might occur in sterilisation were therefore avoided.

---

[1]) Vide Löhnis u. Green, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. p. 534—562; Bd. 40. p. 457.

In the soil tests the flesh meal, horn meal, blood meal, and cyanamide, were not sterilised since it was intended to allow decomposition to proceed under the joint influence of the organisms present in the soil and those in the natural manures themselves — the latter being in any case negligible compared to the vast number of organisms in the 100 grams of live soil used as medium.

In the case of solution tests inoculation was made with 5 gm of soil. In the soil tests the 100 gm. used as medium was of course itself the inoculum.

3. Duration of experiment and temperature of incubation. For solution tests the duration of experiment has been already indicated. In soil tests all analyses were made after 10 days. All tests were carried out in an incubator at a temperature of 20°—22° C with the exception of those involved in the first two samplings. At the time of these August and September (1912) tests, sufficient incubator space was not available and they were accordingly carried out at laboratory temperature, probably averaging a few degrees lower.

4. Sampling of the soil. Four plots (5 m. × 5 m.) were reserved for sampling, as indicated in the next paragraph. In sampling, the surface 8 cm. was removed with a clean spade and the soil at a depth from 8 to 12 cm. taken. For solution tests 300—400 gm. of soil from each plot was carefully taken with a spatula over an area of about one square metre, and placed in sterile bottles. Inoculation into the previously prepared solutions was made within 8 hours of sampling. For soil tests about 5 kilos. of soil were taken from each plot into washed linen bags and worked up in the laboratory within 20 to 40 hours of sampling. In one case (February) in which the soil was frozen, the samples had to be spread out in the laboratory to thaw and bring down to the requisite water-content. In all cases the soil samples were passed through a 3 mm. sieve to remove stones.

The four sampling plots on the field were morked with wooden pegs and the samples in consecutive months taken clock-wise around these. A dry day was always selected for sampling, as far as possible following a more or less rainless week. In this way conditions as uniform as feasible were obtained and sloppy unworkable samples avoided. Moisture determinations were carried out on the fresh samples. The dates of sampling were as follows: August 22nd (1912), September 18th, October 28th, November 23rd, December 30th, February 28th (1913), March 20th, April 24th, May 26th, July 20th. An additional sample from one plot was also taken on August 15th (1913) for nitrification and N-fixation tests.

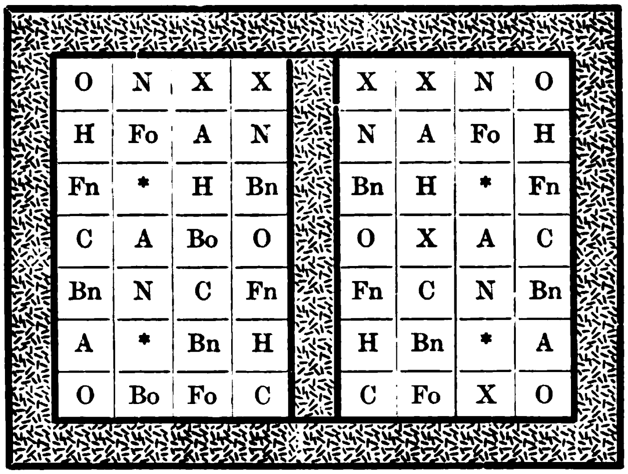
The question of sampling will again be mentioned under the heading of experimental error.

5. Arrangement of the experimental area and execution of field trials. An area 40 metres square, on the Landwirtschaftliche Versuchswirtschaft at Oberholz, was kindly placed at my disposal by Geheimrat Prof. Dr. Kirchner, Director des Landwirtschaftlichen Institutes der Universität Leipzig — to whom I wish to take the present opportunity of tendering my thanks.

The area was arranged in accordance with the following scheme (p. 580).

On the left half of the area the wheat stubbles were broken to a depth of about 7 cm. ("geschält") just after the first sampling on August 22nd; immediately after the third sampling on October 28th the soil was ploughed.

Autumn cultivated Untouched till spring



Autumn cultivated				Untouched till spring			
O	N	X	X	X	X	N	O
H	Fo	A	N	N	A	Fo	H
Fn	*	H	Bn	Bn	H	*	Fn
C	A	Bo	O	O	X	A	C
Bn	N	C	Fn	Fn	C	N	Bn
A	*	Bn	H	H	Bn	*	A
O	Bo	Fo	C	C	Fo	X	O

▨ = Guard strips
A = Sulphate of Ammonia . . . . 20.35 % N
Bn = Blood meal (new). . . . . . . 13.90 % N
Bo = „ „ (original) . . . . . 12.01 % N
C = Cyanamide . . . . 13.50 % N
Fn = Flesh meal (new) . . . . 7.01 % N
Fo = „ „ (original) . . . . . 6.50 % N
H = Horn meal . . . . 13.60 % N
N = Nitrate of Soda . . . . 15.56 % N
* = Sampling plots
X = Superfluous unmanured plots.

The right half remained under stubble until the spring ploughing and cultivation for seed-bed following the seventh sampling on March 20th. At this time the whole area was dressed with Potash salts at the rate of 40 kilos. K_2O per hectare. On April 3rd the area was subdivided, each plot 5 × 5 metres, or $^1/_{400}$th of a hectare, being demarkated by wooden pegs. At the same time the organic manures flesh meal, horn meal, and blood meal, were applied to their respective plots. As will be seen from the diagram, the sampling plots are in duplicate, all others in triplicate. On April 19th the nitrate of Soda, Sulphate of Ammonia, and cyanamide were applied and at the same time the whole area received a dressing of superphosphate at the rate of 40 kilos P_2O_5 per hectare. All nitrogenous manures used were applied in equivalent quantities calculated from their analyses.

On April 21st the whole field including the guard strips (2 metres wide) surrounding the area and dividing its respective halves, was sown with oats.

The crop was harvested at the time of full bloom or incipient seed formation. In harvesting, as in manuring, the various plots were provisionally separated by means of cord stretched around the four pegs morking off each. In manuring the materials applied were first mixed with damp soil, uniformly distributed by hand, and then harrowed in. In harvesting, the crop of each plot was weighed on the field immediately after cutting, and sample of about 4 kilos drawn off into tared paper sacks.

Analysis of crop. The samples for analysis were removed from the field and immediately weighed. On reaching the laboratory these were spread out to dry, snipped up after wilting, and turned daily to hasten dessication and prevent the growth of mould. They were then loosely filled back into the paper bags and stacked on to the wire shelves of an oven at

80° C. When dry the bags were removed, allowed to stand 48 hours, and weighed again. The percentage of "dry matter", is therefore not calculated "dried at 100° C", but this is of no consequence since the only determination wanted was that of total nitrogen and the grinding, subsampling, fine milling, and weighing out for analysis, were carried out on each sample within half an hour of weighing for "dry matter".

As already mentioned the crop was cut in full bloom at which time nitrogen absorption from the soil is almost over. In this way any trouble incident to possible loss of grain in harvesting and threshing was avoided.

IV. Soil and Weather.

The soil of the area used may be described[1]) as a heavy loam practically free from stones and with 92 per cent of its particles below ½ mm. in diameter. The relatively high proportion of clay and silt (42 per cent "abschlämmbare Bestandteile") confers a strong tendency to hardening during drought and to clogging in wet weather. The soil contains 0.10 per cent N, and 0.145 per cent CaO, 0.131 K_2O, 0.045 P_2O_5, soluble in cold concentrated hydrochloric acid. The field responds readily to nitrogenous manuring. The natural chalk content is very low and since the management of the experimental station was taken over by the agricultural authorities of Leipzig University in 1893 regular liming has been practised — averaging 400 kilos per hectare per annum. Owing to regular cultivation the field was in a good state of tilth.

The last four years of the eight course rotation preceeding the experiment are represented: potatoes, dunged; oats; potatoes with artificial manures; wheat. The experiment was commenced shortly after the wheat harvest.

Weather. Records are kept at Oberholz, daily observations being recorded at 8 A. M. Inspection of the books, however, showed numerous errors of entry, especially for the colder winter months, and a complete summary cannot therefore be given. The following tabular statement represents the broad variations of temperature and rainfall in so far as they can be deduced from the records. The entries of the later months of the year showed no apparent errors, and the period covering the time of growth of the crop may therefore be given in more detail. "Average temperature" for Oberholz means average of the maximum and minimum thermometer readings.

For the purpose of comparison the following official data for Leipzig, procured from the "Königlich Sächsische Landes-Wetterwarte" in Dresden, are appended (see p. 582).

From these official Leipzig figures, reckoned against the average (normal) of the previous 50 years, it will be noticed that the winter was a particularly mild one, the month of December showing an average temperature 3.5° C. and a rainfall of 15.5 mm. above the normal. The Autumn months were somewhat colder than usual. The rainfall for February was well below the average and although normally warm in Leipzig, the temperature in the open country at Oberholz was considerably lower, with a spell of 10 days frost towards the end of the month during which the soil was frozen to a depth below 12 cm.

---

[1]) **Kirchner**, Das Versuchsfeld des landw. Inst. d. Univ. Leipzig 1903.

Weather at Oberholz August 1912—August 1913.

Month	Soil temp. ° C at 10 cm. depth	Rainfall in mm.	Days of rain over ½ mm.	Month	Day	Average daily temperature ° C	Soil temp. ° C at 10 cm. depth	Rainfall in mm.	Days of rain (over ½ mm.)	Sunshine Hours	Sunshine Mins.
Aug.	+13 to +18	131	18		1—10	7.6	7.3	32	3	22	52
1912				April	11—20	5.5	4.0	8	4	48	28
					21—30	13.4	10.5	—	—	81	43
Sept.	+8 to +15	58	15	1913	1—30	8.8	7.3	40	7	153	3
					± Norm.	+0.5	—	0.0	—	—	—
Oct.	+2 to +10	44	9		1—10	10.0	10.0	26	4	42	26
1912				May	11—20	10.4	11.5	6	3	51	36
					21—31	15.0	13.9	6	4	74	6
Nov.	+1 to +10	81	13	1913	1—31	11.8	11.8	38	11	168	2
					± Norm.	—1.0	—	—14	—	—	—
Dec.	+ 8 to 0	56	12		1—10	17.6	16.6	12	2	52	15
1912				June	11—20	14.1	14.5	17	4	64	30
					21—30	13.0	14.4	35	5	11	26
Jan.	+2 to —2	39	7	1913	1—30	14.9	15.2	64	11	128	11
1913					± Norm.	—1.4	—	—10	—	—	—
Feb.	+4 to —2	13	7		1—10	13.7	13.6	23	4	23	51
1913				July	11—20	16.4	16.3	3	1	31	22
					21—31	15.0	14.6	17	5	52	15
March	—1 to +8	40	7	1913	1—31	15.0	14.8	43	10	107	28
1913					± Norm.	—3.0	—	—33	—	—	—

Official Leipzig monthly averages.

Month	Average Temp. ° C. Observed	Average Temp. ° C. ± Normal	Total Rainfall mm. Observed	Total Rainfall mm. ± Normal	Month	Average Temp. ° C. Observed	Average Temp. ° C. ± Normal	Total Rainfall mm. Observed	Total Rainfall mm. ± Normal
Aug. 1912	15.6	—1.4	112.0	+48.2	Feb. 1913	2.0	+1.2	17.6	—10.1
September	10.0	—3.9	48.2	+5.1	March	7.1	+3.6	37.5	—2.2
October	7.3	—1.4	38.0	—8.9	April	9.3	+1.0	42.1	+2.0
November	3.2	—0.8	67.0	+26.1	May	14.0	+1.2	33.1	—20.1
December	4.0	+3.5	54.0	+15.5	June	16.6	+0.3	78.7	+5.1
Jan. 1913	—0.2	+0.1	40.0	+15.8	July	16.5	—1.5	48.5	—27.3

Total rainfall for the year Aug. 1912—Aug. 1913 = 49.2 mm. above normal.

Since Oberholz is only a few miles out of Leipzig, the above more reliable official averages will generally be taken in the discussion of results to follow.

V. Results of Laboratory Tests.

The analytical data are to be found at the end of the paper. The dates of sampling have already been mentioned, but the further data concerning the water-content of the samples and the soil temperature at the time of sampling, may now be given:

Order of Sampling	Date	Soil temp. at 10 cm. depth	Percentage of moisture			
			Cultivated in Autumn		Untouched until spring	
			Plot I	III	II	IV
1st	22nd Aug. 1912	13° C.	15.2	15.5	15.6	15.6
2nd	18th Sept. „	10°	16.4	15.8	16.6	16.1
3rd	28th Oct. „	6°	15.8	15.2	15.9	15.8
4th	13rd Nov. „	2°	17.2	16.8	16.6	16.9
5th	30th Dec. „	5°	17.4	17.3	17.7	17.9
6th	28th Feb. 1913	—1°	20.2	22.0	21.2	19.6
7th	20th March „	4°	16.4	15.6	16.4	15.6
8th	24th April „	7°	14.2	14.4	15.0	14.4
9th	26th May „	14°	12.8	12.9	13.2	13.4
10th	20th July „	14°	10.2	10.0	10.4	10.4

As already stated, sampling was as far as possible always carried out after a short spell of dry weather. In this way, in spite of the natural variation in water-content, the samples were, with one exception, in a state reasonably suitable for immediate working up in the laboratory. The exception is represented by February where the sampling had been delayed in anticipation of a coming thaw but was finally carried out with a pick-axe, from the soil still frozen at the 8—10 cm. sampling depth below the thawing surface. Complete thawing only took place in the laboratory and the sloppy soil had of necessity to be partially air-dried before use.

It will be noticed that no regular difference in water-content is observable between the differently cultivated halves of the field. Incidentally it may be added that 17 per cent of moisture corresponds approximately to the water-content adopted as optimum (70 per cent W. H. C.) for the laboratory soil tests.

Before proceeding to a special discussion of the results obtained a few remarks concerning experimental errors may be inserted.

a) Duplicate agreement with the same sample. In so far as the actual laboratory tests with one and the same sample of soil are concerned, the agreement between ammonification duplicates of flesh meal and horn meal, both in solution and in soil media, have always been found very good — provided the material is not too coarse and is uniform in respect to total nitrogen content. The general agreement for solution tests, wherever ammonification is represented by a real figure of 10 mgs. (or more) of ammonia, is 5 per cent, although it often rises to 10 per cent and in isolated instances even higher. For the soil tests the error may be regarded as about 10 per cent, a low registration of residual ammonia being usually balanced by a high figure for ammonia converted into nitrate. The duplicate agreement of blood meal in soil tests was quite good, but in solution tests extremely bad — variations of 40 per cent were frequent and the results obtained are therefore of little or no value.

For nitrification "in soil" the error again ranges around 10 per cent. In "solution" the error is much the same provided the soil is sufficiently dry to allow of thorough sieving and mixing. If an air-dried sample, passed through a 1 mm. (instead of 3 mm.) sieve, and well mixed in a mortar, be used, the error between duplicate determinations can usually be kept below 5 per cent. In the tests of the present investigation, however, it was desired to inoculate the fresh soil (not air-dried) into solution as soon as possible after sampling and although the general duplicate agreement was below 10 per cent, the error with the wetter samples, difficult to sieve and mix, ranged considerably higher — reaching an extreme of 25 per cent in one of the December and one of the February samples where unsieved soil was used for inoculation. Fortunately four determinations had been carried out on these samples and the two suspicious figures were ruled out by inspection.

In respect to fixation of atmospheric nitrogen the tests agreed to within 10 per cent except in one case where they disagreed by 70 per cent. In this case examination of the medium showed vigorous growth of Azotobacter in one flask and interference by the butyric acid bacillus in the other.

With cyanamide, more especially in solution tests, duplicate agreement ranged from 5 per cent to 25 per cent. The commonly occurring bad agreement unfortunately vitiates the results. Disagreement may be largely attributed to the difficulty experienced in using the cyanamide in powder form. The 0.1 gm. added to the otherwise sterile medium, had to be dusted into the flasks to prevent the formation of fluffy balls. The material was found extremely difficult to wet and tended to float. It appears that it is now customary to "oil" cyanamide in preparation for the market, but, unfortunately, I was not aware of that practice at the time of commencing these experiments. Any slight balling of material, or protection against solution, might seriously reduce the amount of cyanamide attacked; or possibly by keeping up a slow diffusion into the solution, retard the activity of those organisms which, though capable of surviving the initial presence of cyanamide, only effect hydrolysis of the urea first formed by the action of the soil colloids. It is already known that the transformation of cyanamide into urea may be effected by the soil colloids irrespective of the biological condition of the soil[1]).

It is highly probable that much better results would be obtained if tests involving the use of cyanamide were carried out with a known aliquot of a cold aqueous solution instead of with the greasy powder itself.

b) Agreement between duplicate plots. The variation between different plots on the same field introduces a complicating factor into all tests and increases the difficulty of getting trustworthy results, more especially when small variations in seasonal changes in the bacterial flora of a soil, or minor differences due to mode of cultivation, are to be investigated.

In respect to ammonification soils from duplicate plots seem to agree fairly well. This is not unexpected since the number and kind of soil organisms capable of readily ammonifying organic nitrogenous manures is very large. Minor differences in the relative numbers of the various species present in the soil inoculum would not be expected to make themselves strongly evident where the actual number of each species is great. Further, since the organisms responsible for ammonification may be aerobic, anaerobic, or facultative, the ammonifying power of a soil would not be expected to vary so markedly with changes in the environment of the soil organisms. In the case of soil tests the "total ammonification", i. e. as measured by the sum of ammonia and nitrate formed during the experimental period, is sub-

---

[1]) Henschel, Das Verhalten des techn. Calciumcyanamids bei der Aufbewahrung, sowie unter dem Einfluß von Kulturboden und Kolloiden. [Diss. phil.] Leipzig 1912.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ject to a general plot variation of about 10 per cent for flesh meal and 15 to 20 per cent for horn meal and blood meal. In the case of solution tests the variation is about 10 per cent except for blood meal whose behaviour is obscured by the erratic variation in tests on one and the same soil sample.

When nitrification is considered the variation between duplicate plots is generally high both in soil and solution tests — often ranging up to 25 per cent or even higher. At the same time any cause of variation under investigation seems to operate more distinctly and the results are less affected by erratic disagreement. Being aerobic, the nitrifying organisms are more sensitive, in respect both to vitality and number, to changes in their environment. Being fewer in the soil any differences in physiological activity, and in actual number, make themselves more evident — especially in solution tests. In soil tests, agreement between duplicates may perhaps be less dependent upon relative number and vigour of the organisms, since the quantity of "inoculum" (100 gms. soil medium) is so high compared to the small amount of ammonia (11.2 mgs.) to be nitrified. But here an equally important cause of variation comes in wherever the soil under investigation is poor in chalk. In a soil test the exigencies of laboratory methods involve the use of a quantity of ammonium sulphate so out of proportion to manuring practice in the field, that the natural chalk content of the soil may become a limiting factor in the laboratory tests[1] and so smother differences which would naturally operate in the field where chalk, though low, might still be sufficient to maintain a neutral reaction over half a century of continuous manuring with sulphate of ammonia. In laboratory tests therefore, what may be called the biological variation between duplicate plots may be obscured by the variation in chemical composition.

An instance of this suspected influence of deficiency of chalk in the case of the Oberholz soil is afforded by the following analytical data (appendix) for the months of November, December and February. The figures are given as mgs. of nitrate N. formed from 11.2 mgs. of N. as $(NH_4)_2SO_4$.

Month	Nitrification in Solution Plot				Nitrification in Soil Plot			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
October	6.6	7.2	6.6	6.5	5.2	10.0	6.0	5.6
November	6.0	6.7	6.8	5.8	4.8	9.0	5.2	5.3
December	8.0	9.3	8.8	9.0	5.0	8.6	5.1	5.1
February	6.3	7.6	5.8	6.7	4.9	8.3	6.0	5.2
March	8.8	8.0	7.1	7.4	6.0	5.8	7.1	5.7

It will be noticed that the nitrifying power of plot II, in the soil tests, is characteristically higher than that of plots I, III, and IV, and that this difference is maintained for four months in succession. As already stated, the successive monthly samples were taken clockwise round the pegs marking the plots. The difference shown by plot II seemed to be invalidating it as a duplicate to plot IV and accordingly the peg was shifted about 3 metres away from its original position in a direction remote from that of previous sampling. The difference in nitrification then disappeared as shown by the March figures and substantiated by subsequent samplings. It is interesting to note that the higher nitrifying power of the soil from this plot is not nearly so marked when it is merely used as inoculum in solution tests receiving excess of chalk in any case. This would seem to indicate that the difference observed in the soil tests is due to a locally higher proportion of chalk on plot II which manifests itself whenever a relatively large quantity of ammonium sulphate has to be converted into nitrate under laboratory conditions. It is considered highly probable that the marking peg for plot II had originally been put down by accident on the site of an old lime-heap — where a cartload of lime had been put down for distribution over the field. It might be maintained that the addition of chalk (1 per cent say) in all soil tests would serve to rule out this limiting factor. It would, but the special virtue claimed for soil tests by some authors, i. e. that the "natural" medium is so provided, would be so destroyed.

---

[1] Cf. Löhnis and Green, Methods in soil bacteriology. VII. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 40. p. 457.)

A difference in chalk content seems also to affect the general "ammonifying power" in soil tests[1]). The total ammonification of horn meal, for instance, is also rather higher in the soil of plot II in the months already mentioned (appendix), although in this case it is the secondary conversion of ammonia into nitrate which is more noticeably concerned.

It may be remarked in passing that a low chalk content does not enter so decisively as a limiting factor to the nitrification of organic manures in soil tests. Here, apart from the fact that calcium carbonate is not required to first remove an acid radicle (as in the case of ammonium sulphate), there is the circumstance that under the well aerated conditions of soil tests the decomposition products are themselves partly basic. Ammonium carbonate, or other basically reacting bodies, probably serve to partially neutralise the nitric acid formed in nitrification. Thus, in previous soil tests[2]), large quantities of organic manures notably horn meal and blood meal (1 to 2 gm.) showed, after 40 days, as much as 50 mgs. of nitrate associated with a large amount of residual ammonia which is absent if the quantity of material to be nitrified is small (0.2 to 0.4 gm.). Where ammonium sulphate is to be nitrified, the real amount of nitrate formed rarely rises above 12 mgs. per 100 gms. of this particular soil, no matter how much ammonium sulphate be added. If, however, chalk be supplied in making the test, the extent of nitrification immediately rises[3]).

c) Errors of sampling per se. As already mentioned, the sampling of the plot was conducted over an area of one square metre at a depth of 8—12 cm. as nearly as could be gauged from the uneven soil surface. The exigencies of successive monthly samplings prevented the use of a larger area for actual sampling, while the large number of analyses which had to be carried out periodically in a limited space of time prevented more than four sampling plots being used — duplicates on each half of the field. Although the method of sampling probably represented the patch sampled, there is no guarantee of similarity with neighbouring patches.

Bacteriological sampling of soil which is taken at a definite level and to be used in the fresh damp condition, is naturally much more troublesome than sampling for chemical analysis, with a corer, where the mixed cores are subsequently air-dried, passed through a 1 mm. sieve and thoroughly

---

[1]) See also P. E. Brown, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. p. 153—161; Bd. 35. p. 238—242.

[2]) Löhnis and Green, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. p. 559 a. 561.

[3]) Löhnis and Green, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 40. p. 457.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

mixed. The question of sampling for bacteriological purposes, and of the magnitude of the quantities suitable for inoculation into solution has already been dealt with by Löhnis and others, but the matter seems to merit still further investigation.

Keeping the experimental errors in view, the experimental results themselves may now be discussed.

1. Results of solution tests.

For the purpose of examining the influence of cultivation and of season the relevant analytical averages (appendix) may be arranged as averages of duplicate plots. Although there are considerable differences in the actual figures for the duplicates I, III, and II, IV, certain features are noticeable. Solution tests may be dealt with first, in the order a) ammonification b) nitrification c) nitrogen assimilation.

a) Ammonification. For the sake of clearness, each set of data is expressed in terms of one figure selected as standard. The respective analytical figures for September (unsterilised flasks inoculated with soil from the half of the field receiving autumn cultivation) are taken for this purpose, and stated as 100.

The data for the ammonification of blood meal in solution are discarded altogether since duplicate agreement was so bad that they are unreliable. For flesh meal and horn meal the results are given in tables I a and I b, respectively.

Table I a. Flesh meal.

Month	Cultivated in autumn				Untouched till spring			
	smaller quantity		larger quantity		smaller quantity		larger quantity	
	sterilis.	unster.	sterilis.	unster.	sterilis.	unster.	sterilis.	unster.
August 22nd 1912	—	99	—	—	—	100	—	—
September 18th .	—	100	—	100	—	101	—	98
October 28th . .	—	115	—	123	—	115	—	113
November 23rd .	106	107	113	112	103	109	109	113
December 30th . .	116	119	123	120	118	120	122	123
February 28th 1913	107	112	119	114	113	108	120	115
March 20th . . .	118	117	118	122	115	118	118	120
April 24th	114	115	125	121	114	116	123	123
May 26th	113	111	117	123	112	113	119	122
July 20th	108	108	117	115	106	111	118	120

Table I b. Horn meal.

Month	Cultivated in autumn				Untouched till spring			
	smaller quantity		larger quantity		smaller quantity		larger quantity	
	sterilis.	unster.	sterilis.	unster.	sterilis.	unster.	sterilis.	unster.
August 22nd 1912	—	98	—	—	—	98	—	—
September 18th .	—	100	—	100	—	104	—	101
October 28th . .	—	115	—	107	—	120	—	113
November 23rd .	126	105	116	104	127	104	119	104
December 30th .	134	127	127	117	129	120	126	118
February 28th 1913	126	108	128	109	126	108	124	106
March 20th . . .	131	111	127	109	128	115	124	106
April 24th	133	116	130	104	133	117	131	103
May 26th	132	110	122	111	131	114	123	109
July 20th	122	111	112	102	123	109	111	109

The blank spaces in the above tables, represent tests in which the influence of time of incubation, instead of the effect of sterilisation, was investigated. 10 day and 20 day periods were compared but the relative figures (appendix) need not be given here. It was considered that the shorter period would prove the more suitable for the purpose in view and the 20 day tests were therefore abandoned. The influence of sterilisation of the medium is not perceptible in the case of flesh meal. The variation between sterilised and unsterilised is within the limits of experimental error. With horn meal on the other hand, there is usually a considerably higher ammonification of the sterilised material. The heating and steeping in sterilisation apparently softens the horn meal and renders it more susceptible to immediate attack by bacteria. The December figures show this effect of sterilisation least of all, and they, curiously enough, received five successive steamings instead of the usual three. Apparently on prolonged heating slight loss may occur, probably as distillation of preformed ammonia.

As was expected, however, the influence of any organisms present in the unsterilised materials themselves is quite negligible when compared with the vast numbers in the 5 gm. soil inoculum, in spite of the fact that if the materials be used without soil inoculation the native spores still capable of life rapidly vegetate, multiply, and effect an ammonification, in 10 days, of about two thirds of that of the inoculated materials.

Influence of quantity of material. This cannot be seen directly from the relative numbers above, but a glance at the analytical data (appendix) shows that within the low limits used, 0.5 and 1 mg. of contained nitrogen per cc. of medium, the ammonification is roughly proportional to the amount — the ammonia yielded by the two-fold quantity being approximately double that yielded by the smaller. The proportionate difference in ammonification with the two quantities is not large enough to merit special discussion. The fact, however, that ammonification is broadly proportional to the amount of ammonifiable substrate is worth a passing comment since Rahn[1]) seems to have clearly drawn conclusions concerning the ammonification of peptone in sand cultures regardless of the absolute quantity of material used. If Rahns own experimental figures be rearranged in terms of the actual quantities of peptone used, most of his conclusions regarding sand cultures, disappear.

Since ammonification is, within certain limits, proportional to the quantity of material used, no advantage is to be gained by attempting to imitate field concentrations of organic manures. Solution tests may therefore be best arranged with moderate quantities so as to facilitate analysis and reduce laboratory error.

Influence of cultivation. The soil from the half of the field which suffered shallow scaling to break the wheat stubbles, and subsequent ploughing at the end of October, shows no consistent variation from the soil of the half left untouched until the whole area was subjected to ploughing and preparation for seed, in March. The ammonification values from August to March (inclusive) vary within an experimental error of 10 per cent, sometimes in one direction and sometimes in the other. The ammonifying efficiency of the soil, as tested in solution, has therefore been affected neither by scaling nor by autumn ploughing.

---

[1]) Rahn, O., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 35. p. 430—450.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Seasonal variation. In considering the values for August and September it must be remembered that the tests in these two months had unfortunately to be carried out at laboratory temperature instead of at the 20—22° C. of the incubator in which all other tests were executed. Certain later comparative tests showed that small variations of temperature do not make much difference where the period of incubation is comparatively long, but in view of the slight differences which have to be considered in the present data, the possibility of error cannot be ignored. Since the difference in mode of cultivation shows no regular influence on the ammonification of the materials, it is permissible to average all monthly figures when considering the specific influence of season. The average of four plots on the same soil, and of four ammonification values for each plot, are so obtained. Sixteen determinations for each material are thus embodied in the new single value for each month. Regular variations (e. g. sterilisation) irrelevant to season will always act in the same direction and arbitrary variations will tend to cancel out, so that the following averages may be regarded as having a low probable error. For the sake of allowing for differences in the August and September tests, due to the temperature difference just mentioned, the seasonal data for these two months are calculated indirectly from the 20 day tests (appendix) where the longer experimental period tends to obliterate the effect of temperature variation. The August and September figures are therefore corrected by comparison with October on the basis of the October average (117). The seasonal ammonification averages then run consecutively as follows:

	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.	Feb.	March	April	May	July
Flesh meal . . .	110	110	117	109	120	113	118	119	116	113
Horn meal . . .	107	110	114	113	125	117	119	121	119	112.

The differences are very small but more or less regular. If it is permissible to draw a conclusion at all, it may be said that there are two maxima, one in the mild wet month of December (1912) and the other in April (1913). These data will be further discussed later.

Ammonification of cyanamide in solution. The following figures are expressed relatively to the lowest analytical number stated as 100.

Month	Cultivated in Autumn	Untouched until spring	Purely seasonal average
August 1912	100	106	103
September 1912	125	128	127
October „	111	109	110
November „	100	103	102
December „	133	136	135
February 1913	138	133	134
March „	146	136	141
April „	129	122	126
May „	154	161	158
July „	186	181	184

These figures are simply given for what they are worth, but they are open to the objections already stated under the heading of experimental error. For accurate observation a more perfect method would first need to be worked out. As previously mentioned, the influence of the soil colloids on the first stage of the ammonification of cyanamide also needs further investigation.

Under the circumstances, therefore, nothing can be said concerning the influence of cultivation. For the same reason no definite conclusions can be drawn in respect to seasonal variation, although the fluctuations are considerable.

The most noteworthy figure seems to be that of July 1913 and it is regretted that circumstances prevented a determination in August 1913 being made for the sake of comparison with the low value for August 1912.

b) Nitrification in solution. The following tabular statement shows the variation in nitrifying efficiency of the soil when used as inoculum in solution tests. The average figures for duplicate plots are expressed in relation to the lowest real analytical number stated as 100.

Month	Cultivated in autumn	Untouched till spring	Average for purely seasonal variation
August 1912	112	114	113
September 1912	122	130	126
October „	206	214	210
November „	200	195	198
December „	262	286	274
February 1913	189	223	206
March „	248	240	244
April „	195	193	194
May „	144	147	146
July „	100	126	113
(August 1913	108		108)

The August 1913 value, given in brackets, represents a duplicate determination on the soil of plot I. It may be added that a sample taken from a potato field immediately to the left of the experimental area, and another sample taken from a field (under oats) a few hundred yards to the right, gave similar values. The figures for August and September 1912 are practically free from the objection of variation due to laboratory temperature, since the experimental period was so long (30 days). In any case their low value is confirmed by the still lower figure for August 1913.

Influence of cultivation. In view of the individual variation of duplicate plots, the influence of autumn cultivation cannot be regarded as noticeable. Such as it is, it is the reverse of that expected. The September nitrification value for the half of the field scaled three weeks before, is slightly lower than for the untouched half, but this may be due to disturbance of the sampling layer by unintentionally deep scaling. The ploughing following the October sampling had certainly mixed the sampling layer with deeper soil but no consequent difference is discernible in November.

Seasonal variation. The averages for consideration (third column) represent the results of duplicate determinations over all four plots — averaging out the negligible influence of cultivation and considering only the specific influence of season. Since each figure is the mean of eight determinations the various experimental errors are considerably reduced. The seasonal variations, however, are so marked that a liberal error may be allowed.

From these figures, then, it may be said that nitrifying inoculation power of the soil rises slowly from August (1912) to October, suffers a negligible relapse in November and continues rising to a maximum in the exceptionally mild December. During January and February (1913), two normal winter months, there is a return to the level of the previous October and November. In March a second maximum occurs and thereafter a steady fall to an August value much the same as that of the previous August. These results will be mentioned again in a subsequent summary.

c) Fixation of atmospheric nitrogen. This may be conveniently shown by stating the average analytical figures directly — milligrams of nitrogen fixed per gram of mannite in the solution.

Month.	Cultivated in Autumn	Untouched till spring
August 1912	2.0	2.0
September „	2.2	2.0
October „	(4.3)	9.8
November „	8.3	8.6
December „	(7.5)	9.7
February 1913	9.7	9.6
March „	9.6	9.7
April „	2.4	2.3
May „	10.3	11.0
July „	10.3	8.3
(August „	—	8.5)

As mentioned earlier, agreement between duplicate tests and plots was generally good. The two cases denoted in brackets are exceptions. Both are on the cultivated half of the field. In the first of these (October), plot I gave 6 mgs. of nitrogen fixed per gram of mannite, with a weak growth of Azotobacter. Its duplicate, plot III, only showed a fixation of 2.5 mgs., and Azotobacter seemed quite suppressed by the butyric acid bacillus. In the second case (December) the highest nitrogen fixation was recorded by plot I (10.2 mgs.) but its duplicate plot III gave only 4.8 mgs. with a weak growth of Azotobacter. These irregularities would seem to be due to disturbance of the 8—12 cm. sampling layer and consequent admixture with deeper soil. This explanation seems the more probable in view of the sharp drop on all four plots after the ploughing at the end of March, where the figures fall from 9.4—9.9 mgs. of nitrogen fixed by inoculation with the March soil, to 2.4—2.1 mgs. with the April samples — invasion by the butyric acid bacillus taking the place of strong growth of Azotobacter. In May all four plots have recovered again.

This sensitiveness to admixture with deeper soil prevents any conclusion being drawn concerning any other influence of cultivation.

The seasonal variation may be best seen from the figures just given for the half of the field left untouched until spring. The August and September samples (1912) showed low N-fixation with domination by Bac. amylobacter. Quite sharply in November, Azotobacter makes its appearance and maintains all through the rest of the year, with, as just stated, the exception of a disappearance in April after ploughing. The seasonal differences are otherwise small. If Azotobacter appeared at all it showed N-fixation of from 9 to 11 mgs. per gram of mannite.

The most remarkable feature of the sequence is the continued appearance in July and August 1913. This is the first summer for 10 years in which mannite solutions infected with Oberholz soil have shown appreciable development of Azotobacter. To confirm this observation two samples of soil were taken from adjacent fields — a potato field to the immediate left of the experimental area, and a field under oats a few hundred yards to the right. The adjoining potato field showed Azotobacter much the same as the experimental area, but the field under oats indicated suppression of Azotobacter by Bac. amylobacter in the solution tests.

2. Results of Tests in Soil as Medium.

The "total ammonification" of flesh meal, horn meal, blood meal, and cyanamide, and the nitrification of ammonium sulphate, in soil media, are considered.

a) The three organic manures may be considered first. It may be seen from the analytical data (appendix) that with these materials, the greater part of the ammonia first formed is converted into nitrate. The frequently occurring negative numbers for residual ammonia represent cases in which nitrification has proceeded faster than ammonification, and the small amount of nitrogen originally present in ammoniacal (or allied) form has been converted into nitrate but incidentally deducted as ammonia in subtracting the controls.

As regards the influence of quantity of material in the soil tests, the analytical data again show that the "total ammonification", i. e. the sum of the ammonia and nitrate formed, is roughly proportional to the quantity of substrate used. In some cases the smaller quantity shows a higher proportionate ammonification than the larger, i. e. the "ammonia + nitrate" formed with the smaller quantity of material is more than half that formed from the larger. The differences, however, with the different samples of soil in different months, are not characteristic enough to merit special discussion, especially as sampling and general experimental errors are comparatively large.

In the following Table II the total ammonification in soil tests is given as a series of numbers expressed in terms of the September data taken as 100.

Table II.

Month	Flesh meal				Horn meal				Blood meal			
	Autumn cultivated		Untouched till spring		Autumn cultivated		Untouched till spring		Autumn cultivated		Untouched till spring	
	small qty.	large qty.	small qty.	large qty.	small qty.	large qty.	small qty.	large qty.	small qty.	large qty.	small qty.	large qty.
1912												
August 22nd	100	—	100	—	100	—	103	—	99	—	104	—
Sept. 18th .	100	100	101	105	100	100	111	123	100	100	107	95
Oct. 28th .	112	107	115	106	123	127	137	134	119	114	122	119
Nov. 23rd .	110	103	109	106	110	108	119	120	122	113	123	116
Dec. 30th .	116	109	120	107	136	146	147	159	123	118	125	117
1913												
Feb. 28th .	98	84	96	85	125	128	122	124	118	107	111	100
March 20th	112	110	111	111	153	163	134	154	148	124	133	112
April 24th .	131	119	131	117	161	191	160	172	141	130	134	123
May 26th .	121	108	118	108	156	176	161	165	135	128	135	121
July 20th .	111	106	110	106	148	147	153	149	125	115	129	113

Influence of cultivation. The extent of ammonification in tests with soil from the two differently cultivated halves of the field is much the same within the limits of plot variation. No influence of autumn cultivation, per se, is apparent.

Seasonal variation. The general monthly sequence of the figures in Table II is much the same with all three materials. Since the influence of quantity of material, of cultivation, and of plot variation, has no distinct relevant relation to season, average monthly figures may be taken for consideration. In the following tabular statement, obtained by averaging horizontal rows of table II, each number is derived from 8 determinations and arbitrary errors are to some extent averaged out.

	Flesh meal	Horn meal	Blood meal
August 1912	(100)	(102)	(102)
September 1912	(102)	(109)	(103)
October „	110	130	119
November „	107	114	119
December „	113	147	121
February 1913	91	125	109
March „	111	151	129
April „	125	171	132
May „	114	165	130
July „	108	149	121

As previously mentioned the August and September figures, in brackets, are open to the objection that these tests were carried out at laboratory temperature instead of at 20°—22° as in the case of all other tests. Considering the short experimental period (10 days) and the rapid ammonification of all three materials in soil media, it is not improbable that they are unduly low. The influence of the slightly lower laboratory temperature appears most strongly marked with horn meal. It is probable that the August and September figures should be nearer to the October number, but still below it. No definite correction, however, can be applied, and the data are therefore left as they stand.

It will be seen that a distinct seasonal variation is shown, although in some cases the differences are so small that they cannot be regarded as beyond experimental error. The difference, for example, between the April and May figures for blood meal is quite negligible. The general sequence, however, is the same with all three materials, and it may be said that there are two maxima, one in December and one in April. A winter minimum occurs in February. July shows a falling off which is probably continued in August to a summer minimum. These figures will come up again for discussion in the summary.

Ammonification of Cyanamide in soil. In these tests the experiments were begun with 0.1 gm. of material (containing 13.5 mg. N.) since it was feared that higher quantities might be sufficiently toxic to mask a seasonal variation. This was continued for four months, but the quantities of ammonia obtained were so small that the 1 to 2 mgs. which had to be allowed as experimental error, meant a percentage error of from 12 to 24. The December tests were therefore put up with 0.5 gm. of cyanamide as well as with 0.1 gm. The duplicate error still remained unfortunately large, although, the conversion of cyanamide into ammonia rose in something like direct proportion to the amount used. Using the factor (3.81) obtained by comparison of the tests on the two quantities, for bringing the earlier data into line, the following tabular statement of results is obtained. The lowest analytical figure is expressed as 100. It may be added that very little of the ammonia first formed was subsequently converted into nitrate and "total ammonification" is registered almost wholly by ammonia.

	Autumn cultivated	Untouched till spring
August 1912	138	143
September 1912	146	156
October ,,	149	150
November ,,	140	140
December ,,	142	147
February 1913	108	100
March ,,	153	140
April ,,	155	153
May ,,	155	160
July ,,	147	155

For reasons already given under the discussion on methods, little can be made of these figures.

The only noteworthy seasonal variation occurs in February. In view of the large error between duplicate determinations, no definite conclusions can be drawn.

b) Nitrification in soil tests. The data for the nitrification of ammonium sulphate are given in the following statement where the lowest analytical figure is put down as 100.

	Cultivated in Autumn	Untouched till spring	Seasonal Average
August 1912	111	116	114
September 1912	112	130	121
October ,,	102	112	107
November ,,	100	106	103
December ,,	101	102	102
February 1913	(118)	104	111
March ,,	131	115	123
April ,,	130	134	132
May ,,	129	138	134
July ,,	126	124	125

The data for plot II in the months of October, November, December, and February, are omitted from the averages for reasons already given in the previous discussion of plot variation. The quantities of nitrate actually estimated varied around 7 mgs., and the error in duplicate determinations was from 0.3 to 0.9 mgs. — or from 4 per cent to 12 per cent. The variation in duplicate plots must also be considered. Under the circumstances no definite conclusions can be drawn, although each figure represents the average of duplicate determinations on duplicate plots. As mentioned earlier, the difference between these figures and those for nitrification "in solution", suggests that the low chalk content of the soil used has restricted nitrification and smothered evidences of seasonal variation. Without a fair margin of chalk to preserve neutrality, the arbitrary variation in duplicate determinations and on duplicate plots is apt to be exaggerated.

The figures, however, do show a tendency towards a spring maximum and a summer minimum.

3. Summary of seasonal variation.

The general conclusions from the data already tabulated may now be summed up. The figures for nitrification in solution, for the ammonification of flesh meal and horn meal in solution, and for the ammonification of flesh meal, horn meal, and blood meal in soil, need only be considered — the tests of nitrification in soil, all those with cyanamide, and those with blood meal in solution, being open to the objections stated earlier. The results on N-fixation need not be discussed again.

In the first place it must be noted that in many cases variation in the data expressing seasonal activity, is often very small. At the same time, the large number of tests carried out justifies the conclusion that these small differences are not accidental but do, in the main, represent real fluctuation.

For nitrification it may be said that there is a rise in activity from August to October. In November there seems to be a tendency to fall, but instead of continuing (as was expected) a marked rise occurs in December. In February there is a winter minimum, in March a low maximum, and thereafter a fall to August again.

For the Ammonification of the organic manures a similar behaviour is shown except that the spring maximum occurs in April instead of in March. The rise from August to October is doubtless exaggerated by the influence of the lower average temperature at which these initial tests were carried out (discussed earlier). The seasonal variation shown in the tests on the three materials, flesh meal, horn meal, and blood meal, although unequal in intensity, is similar in type.

As to the explanation of this seasonal influence upon the general bacterial activity of a soil, no difinite explanation need be offered. If, however, in accordance with certain current views, the activity of organisms of the protozoa type in the soil, be admitted, the seasonal fluctuations may be attributed to their preying upon the soil bacteria. That larger organisms of this type can exercise a marked influence upon the bacterial flora of soils is strongly indicated by the work of Russell and Hutchinson published in recent years (Journal of Agricultural Science and elsewhere). That protozoa, considerable in number and varied in kind, do exist in the Oberholz soil, has been shown by Mr. Andrew Cunningham of this laboratory. In his results, to be published shortly, evidence will be adduced to show that the protozoa examined by him exist in the soil in active as well as in encysted form. Irrespective of the possible influence of organisms of the protozoa type, one might, a priori, expect to find a fall in general bacterial activity in winter, followed by a rise in the warmer spring months; and that this rise would be carried through summer so long as the moisture content of the soil offered favourable conditions for development. If, however, the development of predatory protozoa be regarded as favoured by the increase in the number of the general soil bacteria, one would expect an increase in number of the larger organisms to follow fast on the heels of numerical increment of the smaller. Destruction of bacteria by protozoa might then be supposed to lower the bacterial activity in the soil. This is precisely what is indicated by the observed fall in ammonification and nitrification following the spring maxima. That the decline in nitrifying activity commences sooner, and is more marked in character, than the decline in ammonification, may be due to the fact that the nitrifying organisms are fewer in number and single in kind, whereas the organisms responsible for ammonification are so numerous and so varied that they suffer less readily and any diminution of their activity is not so clearly brought out in laboratory tests under the conditions adopted for the present work.

The summer minimum recorded may represent the period of ascendency of the protozoa, or it may be partially due to a lowered moisture content of the soil during the drier months. One could not properly attribute it to both factors acting in concert, since the protozoa are probably much more sensitive to shortage of moisture, than the bacteria. If one then supposes that the protozoa diminish as a result of bacterial suppression and soil dessication, the explanation of the autumn rise offers no difficulty. It is simply the commencement of another cycle.

In the colder winter months a general depression of organic life might be expected to follow. That this is so small (February) in the present experiments is probably to be ascribed to the mild character of the winter. The unexpectedly high bacterial activity in the comparatively warm month of December is not altogether inexplicable. The conditions of such a month might be just sufficient to suppress the activity of the more sensitive larger organisms while allowing a free field for the development of bacteria — even with the temperature conditions far below the optimum for the latter. According to the Oberholz records the temperature at a soil depth of 10 cm. ranged up to 8° C. and never fell below zero, and according to the official Leipzig records the daily temperature averaged 3.5° C. above the mean for the preceeding 50 years. In respect to temperature, January was a normal winter month. From the Leipzig records the February temperature is seen to have been 1° C. above the normal, but during the clearer weather the temperature in the open country at Oberholz was rather lower, and the February sample of soil was taken after 10 days frost which had penetrated to a depth of 12 cm. March was an exceptionally warm month and the early spring maximum is probably due to this. That it is again so slight may be due to a rapid recovery of protozoa after the mild winter.

The generally slight variations recorded in these experiments as compared with the more marked variation observed by Löhnis (l. c.) may, as just indicated, find explanation in the mild character of the winter. It seems justifiable to assume that any influences which affect both bacteria and protozoa alike, operate more powerfully on the larger more sensitive organisms. In a year with extreme variations of weather conditions one might expect to find the development of protozoa succeeding bacterial increment with less facility. A warm spring following an exceptionally severe winter might be expected to show a sharp maximum followed by a delayed depression. In the present experiments the maximum occurs early but is rapidly replaced by decline.

VI. Results of Field Experiments.

From seed-time to harvest the weather was uniformly favourable for the growth of the oats sown. There were no late frosts. The average temperature during May and June was slightly above the normal and the rainfall in June rather higher than usual. Although the May rainfall was only about three fifths of the May average over the preceeding fifty years, it showed itself quite sufficient on the retentive Oberholz soil. The rains of the winter had been above the normal.

The visits to the field gave little preliminary information of the crop response to the differential manuring and even at the time of harvesting in full bloom the differences detectable with the eye were not consistent enough to be worthy of record.

The crop yields (appendix), the percentage of nitrogen in the crop as cut, and the total nitrogen taken up per plot, averaged over the triplicate plots used, are given in table III. The data are given in round numbers stated relatively to the corresponding unmanured averages of the autumn-cultivated half of the area, as 100.

Table III.

Manuring	Cultivated in Autumn			Untouched till spring		
	Weight of crop	Nitrogen in crop		Weight of crop	Nitrogen in crop	
		%	Total		%	Total
Nitrate of soda	135	121	163	132	105	139
Sulphate of ammonia . . .	132	118	156	130	103	134
Cyanamide	130	112	146	128	99	127
Flesh meal						
New sample	112	110	123	101	106	107
Original „	109	110	120	107	98	105
Blood meal						
New sample.	111	112	124	105	102	107
Original „	109	108	117	—	—	—
Horn meal	107	109	117	102	98	100
Unmanured	100	100	100	88	91	80

In so far as agreement in crop yields is concerned (appendix) the nitrate of soda plots showed best with a maximum disagreement of 6 per cent between extremes. The cyanamide plots were worst with a 20 per cent disagreement between lowest and highest. The averaging of three plots should, however, materially reduce this error.

As already mentioned the original amount of blood meal at disposal was found too meagre for the six plots required and a new sample had to be procured. Since the laboratory tests carried out for the sake of comparison with field results showed such a striking difference in behaviour between the old and the new samples in respect to ammonification in solution, it was considered worth while to institute field comparison as well. The original sample which showed only half the ammonification of the new sample in 20 day solution tests, was therefore used up by adding triplicate plots to the half of the area which had received autumn cultivation — as indicated in the previously given diagrammatic manuring scheme. At the same time two different samples of flesh meal were compared in duplicate on both halves of the field.

In regard to the differences in actual yield of crop, it will be noticed from table III that with the exception of the unmanured plots, the size of the crop does not vary widely with the different forms of nitrogenous manure used. The position, however, is quite different when the percentage of nitrogen in the various crops is taken into consideration. The total nitrogen taken up from the soil at once assumes a regular gradation from the nitrate of soda to the horn meal plots, and the half of the field scaled in August and ploughed in autumn and in spring shows a marked superiority over the half receiving only spring cultivation.

In regard to the small differences in crop yield as compared with the large differences in nitrogen content, it may be again mentioned that the oats were harvested in full bloom when at least the main nitrogen absorption is over [90 per cent according to Liebscher[1])] but general growth still incomplete. Doubtless the crop yields would have run more parallel with the nitrogen yields if the oats had been harvested ripe. The same explanation probably holds for the small but regular gradation in the percentage of nitrogen in the crops which had received manures of varying degrees of immediate availability, from nitrate of soda to horn meal.

It may be added that the agreement between triplicate plots is in general much improved when the total nitrogen in the crops is considered instead of the crop weights. This however is not always the case. One of the cyanamide plots and one of the horn meal plots, for instance (autumn cultivated), still remain about 16 per cent below the average of the other two. Otherwise the error rarely rises above what may be considered the permissible error of 10 per cent.

The results may now be considered.

a) Influence of autumn cultivation. Reference to the third and sixth columns of table III shows very clearly that the total nitrogen taken up from the area receiving additional cultivation is uniformly about 20 per cent higher than that from the half of the field receiving only spring ploughing and preparation for seed bed. The difference between the unmanured averages is exactly 20 per cent, and the small variations from this on the manured plots may either be inherent or due to different utilisation of the applied nitrogen. This is particularly interesting in view of the popular opinion held by a large number of farmers in Germany, who practice stubble-breaking and autumn ploughing in the belief that such treatment is equivalent to half a "centner Chilisalpeter pro Morgen". This corresponds to 15 Kilos of nitrogen per hectare against an equivalent of 8 Kilos representing the 20 per cent increase under discussion and of 10 Kilos in similar experiments done by Löhnis 10 years ago[2]). It is interesting to note that the response to cultivation is shown as freely on the manured as on the unmanured plots.

b) Utilisation of manures applied. The percentages of nitrogen (added in equivalent quantities per plot) recovered from the different manures applied, are as follows:

Area cultivated in	$NaNO_3$	$(NH_4)_2SO_4$	Cyanamide	Flesh meal old	Flesh meal new	Blood meal old	Blood meal new	Horn meal
Autumn and Spring	63	56	46	23	20	17	24	17
Spring only	59	54	47	27	25	—	27	20

---

[1]) Liebscher, Der Verlauf der Stoffaufnahme. 1888. p. 40.

[2]) Mitt. d. Landw. Instit. Leipzig. Heft 7. p. 71.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

The difference in respect to utilisation of applied nitrogen, between the halves receiving different cultivation, is not great, and since the numbers on the upper row involve the assumption that the response to cultivation, just discussed, has been perfectly uniform over each individual plot, it does not seem legitimate to draw any conclusion. In any case the differences are on the border of experimental error.

The average of 62 per cent of nitrogen recovered from nitrate of soda may be regarded as quite normal. According to Maercker[1]) the utilisation of nitrate by oats is 55—66 per cent. The somewhat lower recovery from sulphate of ammonia deserves no special comment. Cyanamide shows a distinctly lower recovery for which no reason is apparent. The sample used was of low grade, containing 13.5 per cent of nitrogen. Beyond total nitrogen determination no particular analysis was made. It may be noted, however, that if the worst plot be excluded from the average, cyanamide shows up almost as well as sulphate of ammonia.

No difference between the two samples of flesh meal is noticeable. Restricting comparison to plots receiving similar cultivation, the difference 3 only means a variation, in total nitrogen absorbed, of between 2 per cent and 3 per cent. Comparing the two samples of blood meal a rather higher difference is noticeable — the difference 7 representing roughly 6 per cent of the total nitrogen in the crop of the plots concerned. This is small and may represent experimental error but in virtue of its possible significance it will be mentioned again in comparing laboratory with field results. Horn meal shows rather a lower efficiency than flesh meal, or than the superior sample of blood meal. This is probably a true relationship but no stress can be laid upon the results from six plots when the actual utilisation is so low that the field error rises in importance. All three organic manures show a utilisation ranging around one third of that of sodium nitrate.

VII. Comparison of Laboratory with Field Results.

It would obviously be of indisputable advantage if simple laboratory tests could be arranged to show the capacity of different soils to reduce complex nitrogen compounds supplied in different forms, to a simple form available for plant requirements, or to show the capacity of different nitrogen compounds so supplied to undergo the requisite transformation in one and the same soil. A great deal of laboratory work on soil problems has been carried out on the chemical side, but the question here at issue is biological and only indirectly chemical — the break-down of nitrogenous complexes being the work of bacteria.

The two main methods in use for studying the bacteriological activity of soils involve the use, of (a) artificially compounded solutions of known composition, inoculated with soil, and (b) the soil itself. Quite obviously the extent of decomposition in laboratory tests is a purely arbitary function of time, temperature, and medium. A time may be arbitrarily set for tests in solution, another for tests in soil, and a third (by continuous cropping) for utilisation in the field, in such a way that the arbitrary numbers expressing decomposition are identical. The practical point at issue is that of settling laboratory conditions such that information applicable, as far as possible, to field practice, may be obtained. It is too much to expect that field conditions can be imitated. The aim should be rather to determine controllable laboratory variants in such a way that variable field conditions can be reflected at will.

---

[1]) Maercker, Zeitschr. d. landw. Central-Ver. d. Prov. Sachsen. 1884. H. 4 u. 5.

In the following table IV the average results of the tests on the soil samples taken in April and May are compared with the results in the field. Since nitrate of soda is "completely available", although not completely utilised, for plant requirements, it may be taken as standard for field comparison and the extent of utilisation of nitrogen in the other manures expressed relatively — presuming that the amount of ammonia arising by hydrolysis of the nitrogenous complexes is utilised in the same proportion as in the case of directly applied nitrate. For laboratory tests the numbers for comparison will then be represented by the actual percentage of the total nitrogen of the manure which is converted into ammonia or nitrate under the arbitrary laboratory conditions selected. In the present instance the laboratory data are those for the "smaller quantities" of materials (appendix). The "ammonification" in the field is taken as the ratio, "utilisation of nitrogen from the manure, to utilisation of nitrogen from sodium nitrate" — the actual absorption of sodium nitrate by the crop (62 per cent) being set down as 100. The actual percentages of the total nitrogen of the manures, recovered in the crop, are also given for comparison.

Table IV.

Medium	Total Ammonification of				
	Flesh meal	Horn meal	Blood meal old sample	Blood meal new sample	Cyanamide
Soil	43	37	46	54	48
Solution	44	19	19	41	44
The field	39	30	27	42	75
Actual % of manurial nitrogen recovered in the crop	24	18.5	17	25.5	46.5

It is seen that according to this method of comparison the ammonification of flesh meal is roughly the same in solution, in soil, and in the field. For Horn meal the figure for ammonification in the field is 11 above that of the solution tests and 7 below that of the soil tests. For the new sample of blood meal the figures for solution and for the field are much the same while the number for the soil test is considerably higher. The original sample of blood meal shows a lower general ammonification than the new sample and a lower utilisation in the field, but the solution tests give a figure considerably closer to the field value. This point is of some interest. The two samples of blood meal behave quite differently in laboratory tests — the new sample showing double the ammonification of the original sample in solution but only a 20 per cent higher ammonification in soil tests. In this particular instance, then, the solution tests have pointed more clearly (in qualitative fashion) to a difference in the field value of the two samples. It must however be remembered that the triplicate agreement of the plot tests was not particularly good in the case of the old sample of blood meal,

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

and further that a single set of field experiments does not afford sufficient evidence for anything like a general conclusion.

From the general comparative results it appears that solution tests afford data in fairly close agreement with field results, in the case of the heavy loam soil at Oberholz. In a lighter soil the more rapid ammonification obtained in soil tests may possibly give data closer to field results. That organic manures are only slowly utilised on the heavy Oberholz soil is shown by the following comparison with a light sandy soil (Göhrisch) made by Bönisch[1]) in 1911. The data are given directly as percentages of manurial nitrogen recovered in the crop.

	Flesh meal	Horn meal	Blood meal
Oberholz	27	27	28
Göhrisch	70[2]) (50?)	42	42

The utilisation of all three manures on the Oberholz soil is roughly the same, and very considerably lower than on the more open Göhrisch soil. The difference is probably due to superior aeration and more perfect distribution of the material in the more friable soil.

The data of table IV for cyanamide need not be discussed since the laboratory tests are open to the objection mentioned in previous sections.

Nitrification tests. The tests either in soil or in solution are not of much value in determining the extent of transformation in the field. It has already been suggested that nitrification in soil tests is largely dependent upon the chalk content of the soil.

This soil is therefore not suitable for direct soil tests. In the solution tests 55 per cent of the 11.2 mgs N. added as ammonium sulphate was converted into nitrate in 30 days, after inoculation with the April sample of soil. In the field, however, where aeration is good and the dressing of ammonium sulphate still very small compared to the chalk content of the soil, complete conversion into nitrate probably takes place very rapidly, and ammonium sulphate in most cases becomes, as readily utilised as nitrate of soda. The chief value of nitrification tests is perhaps in the comparative study of the nitrifying efficiency of different soils.

Comparison of laboratory methods. Of recent years many authors have persistently condemned "solution methods" for soil investigation and have exclusively recommended the adoption of the soil itself, in the natural condition, as medium for laboratory tests. In originally designing the work recorded here, it had been hoped that by carrying out all tests both "in soil" and "in solution", some information might be gained concerning the respective value of the two methods. In so far as the results upon seasonal variation are concerned, little definite information has been afforded. The variations in the ammonification tests are rather more distinct in soil than in the solution tests, but are in any case so indistinct that they do not afford suitable material for comparison. In the nitrification tests, on the other hand, the solution method, has shown itself much the superior. In the field tests the solution method has shown itself as serviciable as the soil method. It is quite probable that both methods, with suitably arranged laboratory conditions would yield parallel results. On general theoretical grounds the simplicity and adaptibility of synthetic solutions of known composition, is some commendation. It is interetsing to note that neither method showed any difference between the soil on the different halves of the field receiving different cultivation, in spite of the fact that the field experiments showed a marked difference in favour of the additional autumn cultivation.

---

[1]) Böhnisch, Zersetzung und Wirkung organischer Stickstoffdünger. [Diss. Phil.] Leipzig 1911.

[2]) Duplicate agreement bad. If the high value of the duplicate be rejected a figure of roughly 50 is obtained.

VIII. Summary and Conclusions.

Laboratory tests are recorded in repect to ammonification, nitrification, nitrogen fixation and cyanamide decomposition, in both soil and solution media, carried out on samples of soil taken at approximately monthly intervals throughout the year from August 1912 to August 1913. The influence of Season and of soil cultivation are considered. Laboratory data are compared with the results of manuring experiments on the soil area used for sampling. The results offer some points of interest.

1. A slight seasonal variation is shown, which, except in the case of nitrification in solution where the results are well marked, lies on the border of the experimental error between duplicate tests. The large number of tests carried out, however, averages down the experimental error and allows of certain conclusions being drawn.

a) The bacterial activity of the soil in respect to the ammonification of the organic manures flesh meal, horn meal, and blood meal, showed a rise from August to October, a tendency to fall or remain constant in November, and a rise to a maximum in December. This was followed by a minimum in February and a low maximum in April. From April to July there was a slight fall which was probably continued to a summer minimum in August.

b) The variation in activity in respect to nitrification was similar to that for ammonification, except that the spring maximum occured in March and the decline to a summer minimum commenced in April.

The smallness of the actual variation in ammonification and nitrification, and the unexpected December maximum, are attributed to the exceptionally mild character of the winter. In respect to the cause of seasonal variation, it is regarded that larger organisms of the protozoa type play an important part.

c) Nitrogen-fixation in 1 per cent mannite solution was low with the soil samples of August and September 1912. In subsequent months a fairly constant fixation of about 10 mgs. N. per gram of mannite was recorded, except with the soil samples taken after ploughing and disturbance of the sampling layer. Nitrogen-fixation through Azotobacter was observed in July and August of 1913, although no perceptible growth of Azotobacter had occurred in the same mannite solution inoculated with soil sampled in August 1912, or in any other summer of the preceeding ten years.

d) Tests carried out on the decomposition of cyanamide showed no results of value, owing to irregularity of results arising through defects in the laboratory methods employed.

1. Ammonification of Flesh Meal.

Month	Solution tests (mgs N. as ammonia)						Soil tests (mgr N.)					
	Quantity		Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV	Quantity	N. as	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV
1912 Aug. 22nd	0.4 g.	10 days 20 „	10.0 12.2	10.2 13.0	10.0 13.2	10.1 12.8	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	0.9 7.9	—0.3 8.9	0.6 8.2	—0.3 9.4
Sept. 18th	0.4 g.	10 days 20 „	10.0 13.7	10.3 12.0	10.2 12.0	10.0 13.5	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	1.1 7.7	0.2 8.7	1.0 7.8	0.0 8.9
	0.8 g.	10 „ 20 „	21.0 24.3	19.6 24.0	19.0 25.2	19.8 25.6	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	10.0 8.4	7.3 11.7	8.6 9.0	6.8 12.0
Oct. 28th	0.4 g.	10 days 20 „	11.7 13.9	11.5 13.2	11.5 13.8	11.7 13.9	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	0.6 9.4	—0.9 11.3	—0.6 10.4	—0.5 10.5
	0.8 g.	10 „ 20 „	24.4 29.1	22.7 28.9	24.7 28.7	22.5 28.7	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	5.8 13.6	1.1 18.4	3.3 15.9	4.0 14.7
Nov. 23rd	0.4 g.	sterile not „	10.8 10.6	10.4 11.0	10.6 10.8	10.4 11.0	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	0.3 9.5	—0.9 10.7	0.2 9.4	0.2 9.2
	0.8 g.	sterile not „	22.1 23.0	21.8 22.4	23.0 21.8	21.8 22.9	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	5.2 13.4	3.4 16.0	4.7 13.7	5.4 13.4
Dec. 30th	0.4 g.	sterile not „	11.5 12.0	11.7 12.2	12.0 12.0	12.2 12.0	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	0.5 9.9	—0.7 12.1	0.3 9.7	0.3 9.6
	0.8 g.	sterile not „	24.7 24.2	24.9 24.3	24.4 24.0	24.1 24.9	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	5.4 14.8	1.4 18.0	5.5 13.6	5.1 13.9
1913 Feb. 28th	0.4 g.	sterile not „	11.4 11.5	11.4 11.2	10.2 11.1	11.4 10.7	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	0.5 8.3	—0.5 8.9	—0.5 8.9	—0.5 9.0
	0.8 g.	sterile not „	24.2 22.7	24.0 22.9	23.3 22.8	24.1 23.2	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	1.4 13.6	1.1 13.1	2.0 13.1	2.4 13.8
March 20th	0.4 g.	sterile not „	11.9 12.0	11.6 12.1	12.0 11.7	11.6 11.7	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	—0.4 10.2	0,1 9.5	—0.6 10.6	—0.2 10.2
	0.8 g.	sterile not „	24.2 25.0	23.8 24.0	23.0 24.0	23.5 24.0	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	5.0 15.4	5.6 14.0	3.8 15.4	5.9 14.2
April 24th	0.4 g.	sterile not „	11.4 11.5	11.6 11.9	11.5 11.7	11.4 11.5	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	—0.2 11.4	—0.4 11.8	0.4 11.4	0.2 11.4
	0.8 g.	sterile not „	25.8 24.1	25.3 25.0	24.3 24.2	24.1 24.2	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	5.9 15.5	4.6 16.4	5.9 15.5	5.5 15.7
May 26th	0.4 g.	sterile not „	11.5 11.1	11.6 11.5	11.3 11.3	11.1 11.4	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	0.3 10.6	—0.5 11.1	0.2 10.1	0.1 10.1
	0.8 g.	sterile not „	23.2 24.7	23.8 24.2	23.5 24.5	23.9 24.6	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	5.1 14.1	4.6 15.0	5.6 14.1	5.1 14.2
July 20th	0.4 g.	sterile not „	10.7 11.0	10.7 11.5	11.2 10.8	10.8 11.0	0.4 g.	NH_3 N_2O_5	—0.6 10.4	—0.4 10.1	—0.6 10.3	—0.3 10.1
	0.8 g.	sterile not „	22.8 23.0	23.0 24.0	24.0 23.2	24.0 24.0	0.8 g.	NH_3 N_2O_5	4.0 15.3	4.5 14.9	4.4 14.4	5.1 14.1

2. Ammonification of Horn Meal.

Month	Solution tests (mgs. N. as ammonia)						Soil tests (mgs. N.)					
	Quantity		Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV	Quantity	N. as	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV
1912 Aug. 22nd	0.2 g.	10 days	4.4	4.1	4.2	4.5	0.2 g.	NH_3	—0.4	0.0	0.1	—0.4
		20 „	5.9	5.9	5.9	6.1		N_2O_5	6.7	6.7	6.5	6.9
Sept. 18th	0.2 g.	10 days	4.4	4.7	4.4	4.5	0.2 g.	NH_3	—0.1	—0.1	0.0	0.0
		20 „	6.1	5.9	5.9	6.1		N_2O_5	6.5	7.0	6.4	7.3
	0.4 g.	10 „	8.6	9.0	9.0	8.8	0.4 g.	NH_3	3.5	3.9	3.4	3.8
		20 „	11.6	11.5	11.1	11.2		N_2O_5	6.9	8.9	6.8	8.8
Oct. 28th	0.2 g.	10 days	5.2	5.1	4.9	5.5	0.2 g.	NH_3	0.6	—0.6	—0.7	0.0
		20 „	6.4	6.3	6.6	6.4		N_2O_5	7.0	9.2	8.9	9.0
	0.4 g.	10 „	9.4	10.1	9.4	9.9	0.4 g.	NH_3	3.3	—0.7	2.0	3.0
		20 „	11.8	11.8	12.3	12.1		N_2O_5	9.1	14.3	11.7	11.0
Nov. 23rd	0.2 g.	sterile	5.5	5.4	5.6	5.8	0.2 g.	NH_3	0.3	—0.8	0.2	—0.2
		not „	4.5	4.6	4.7	4.5		N_2O_5	6.8	9.1	6.7	7.0
	0.4 g.	sterile	10.4	10.3	10.0	10.6	0.4 g.	NH_3	1.1	0.5	1.8	2.2
		not „	9.2	9.3	9.1	9.0		N_2O_5	9.8	12.6	9.5	9.5
Dec. 30th	0.2 g.	sterile	5.9	5.7	5.9	5.7	0.2 g.	NH_3	0.3	—0.4	0.4	0.3
		not „	5.7	5.3	5.5	5.3		N_2O_5	7.9	11.0	8.8	8.0
	0.4 g.	sterile	11.1	11.3	11.3	11.0	0.4 g.	NH_3	4.5	1.9	4.5	4.4
		not „	10.1	10.6	10.5	10.2		N_2O_5	10.9	15.8	10.5	10.7
1913 Febr. 28th	0.2 g.	sterile	5.6	5.6	5.5	5.5	0.2 g.	NH_3	—0.2	—0.8	—0.8	—0.4
		not „	4.7	4.8	4.8	4.7		N_2O_5	8.3	8.6	8.7	8.2
	0.4 g.	sterile	11.3	11.1	11.3	10.7	0.4 g.	NH_3	3.3	0.5	0.6	2.2
		not „	9.8	9.8	9.4	8.9		N_2O_5	10.6	12.1	11.9	10.6
March 20th	0.2 g.	sterile	5.9	5.6	5.6	5.7	0.2 g.	NH_3	0.7	0.7	—0.2	1.6
		not „	4.8	5.0	5.0	5.1		N_2O_5	9.6	7.5	9.5	7.6
	0.4 g.	sterile	11.5	11.1	10.9	10.7	0.4 g.	NH_3	5.1	4.1	3.7	5.1
		not „	9.7	9.6	9.5	9.0		N_2O_5	12.7	10.3	12.1	10.2
April 24th	0.2 g.	sterile	5.8	6.1	5.9	5.7	0.2 g.	NH_3	0.9	—0.1	0.4	0.8
		not „	5.0	5.0	5.2	5.3		N_2O_5	9.8	9.8	9.5	9.7
	0.4 g.	sterile	11.5	11.6	11.3	11.4	0.4 g.	NH_3	4.6	4.3	6.4	5.4
		not „	9.3	9.2	9.0	9.0		N_2O_5	15.5	12.8	12.8	12.9
May 26th	0.2 g.	sterile	5.9	5.8	5.7	5.7	0.2 g.	NH_3	0.6	0.1	0.5	0.2
		not „	4.8	4.9	4.9	5.1		N_2O_5	9.6	10.3	9.3	10.0
	0.4 g.	sterile	11.1	10.8	10.3	10.9	0.4 g.	NH_3	5.8	4.8	5.7	5.3
		not „	10.0	10.0	9.5	9.2		N_2O_5	12.4	12.0	12.3	11.9
July 20th	0.2 g.	sterile	5.3	5.5	5.4	5.3	0.2 g.	NH_3	1.1	1.0	0.5	0.4
		not „	4.7	4.7	5.1	4.9		N_2O_5	8.4	8.6	9.0	9.6
	0.4 g.	sterile	9.7	9.6	10.0	10.0	0.4 g.	NH_3	3.1	3.6	2.4	4.5
		not „	8.7	9.5	9.2	9.7		N_2O_5	12.1	11.1	12.6	11.3

3. Ammonification of Blood Meal.

Month	Solution tests (mgs. N. as ammonia)						Soil tests (mgs. N.)					
	Quantity		Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV	Quantity	N. as	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV
Aug. 22nd 1912	0.2 g.	10 days	3.1	3.0	3.5	3.0	0.2 g.	NH_3	3.2	2.6	3.1	2.0
		20 „	4.7	5.2	4.9	5.4		N_2O_5	5.3	6.2	5.3	7.0
Sept. 18th	0.4 g.	10 days	6.8	7.4	7.8	6.7	0.2 g.	NH_3	4.0	2.9	1.6	1.5
								N_2O_5	5.5	6.7	6.1	7.2
		20 „	10.0	9.7	9.8	10.3	0.4 g.	NH_3	11.1	8.9	9.1	8.1
								N_2O_5	7.4	9.0	7.9	7.5
Oct. 28th	0.4 g.	10 days	4.0	4.5	5.1	5.0	0.2 g.	NH_3	3.5	0.2	0.8	1.6
								N_2O_5	7.9	9.8	9.3	9.3
		20 „	7.2	7.0	7.5	8.2	0.4 g.	NH_3	9.6	5.1	8.4	10.2
								N_2O_5	11.8	15.1	13.2	11.9
Nov. 23rd	0.4 g.	sterile	8.2	9.4	10.0	8.1	0.2 g.	NH_3	3.0	0.2	3.0	1.8
								N_2O_5	7.7	10.6	7.4	8.6
		not „	8.2	8.6	7.4	8.4	0.4 g.	NH_3	9.9	6.0	8.4	9.2
								N_2O_5	11.7	14.9	11.8	11.3
Dec. 30th	0.4 g.	sterile	7.1	10.3	9.1	7.4	0.2 g.	NH_3	1.9	0.2	2.8	2.1
								N_2O_5	8.5	11.1	7.9	8.0
		not „	13.0	13.1	9.4	10.9	0.4 g.	NH_3	9.7	5.1	9.8	9.3
								N_2O_5	11.5	16.0	11.0	11.1
Feb. 28th 1913	0.4 g.	sterile	8.7	8.7	9.2	9.3	0.2 g.	NH_3	1.4	0.0	0,1	0.7
								N_2O_5	8.9	8.8	9.7	9.5
		not „	8.7	8.5	8.7	7.2	0.4 g.	NH_3	8.1	3.9	4.5	6.0
								N_2O_5	11.8	12.3	13.7	13.1
March 20th	0.4 g.	sterile	8.3	7.5	7.7	8.6	0.2 g.	NH_3	2.9	3.7	3.0	3.5
								N_2O_5	9.8	7.8	9.8	7.8
		not „	9.8	6.8	9.4	7.8	0.4 g.	NH_3	9.2	9.7	9.4	9.3
								N_2O_5	12.7	10.5	12.8	10.3
April 24th	0.4 g.	sterile	9.3	9.4	8.1	9.0	0.2 g.	NH_3	2.0	1.5	3.3	2.1
								N_2O_5	9.9	9.8	8.9	9.8
		not „	9.2	10.2	11.2	9.8	0.4 g.	NH_3	10.0	8.8	9.7	9.4
								N_2O_5	13.8	12.9	12.7	12.5
May 26th	0.4 g.	sterile	7.7	7.0	9.0	7.5	0.2 g.	NH_3	2.8	2.1	3.1	2.7
								N_2O_5	9.1	9.2	8.5	9.1
		not „	10.0	8 6	8.0	7.9	0.4 g.	NH_3	10.3	8.1	10.1	10.1
								N_2O_5	12.8	12.3	12.4	12.5
July 20th	0.4 g.	sterile	7.8	6.9	7.9	6.8	0.2 g.	NH_3	2.1	2.1	0.6	2.1
								N_2O_5	9.1	8.0	9.5	9.1
		not „	11.8	9.8	11.6	10.0	0.4 g.	NH_3	9.6	7.5	5.7	8.4
								N_2O_5	12.4	13.2	13.2	13.1

4. Ammonification of Cyanamide.

Month	Solution tests (mgs. N. as NH_3 formed)					Soil tests (mgs. N. as NH_3 + nitrate if any)				
	Quantity	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV	Quantity	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV
August 22nd 1912 .	0.1 g.	4.4	4.4	4.0	4.5	0.1 g.	8.1	8.3	7.7	7.8
September 18th . .	0.1 g.	5.4	5.4	5.3	5.4	0.1 g.	8.6	8.9	7.9	8.7
October 28th . . .	0.1 g.	4.8	5.1	4.5	4.0	0.1 g.	8.8	8.5	8.4	8.5
November 23rd . .	0.1 g.	4.1	4.5	4.3	4.1	0.1 g.	7.9	8.0	7.8	7.8
December 30th . .	0.1 g.	4.7	4.8	6.5	6.6	0.5 g.	36.3	28.8	25.0	34.1
February 28th 1913	0.1 g.	5.6	5.4	6.0	5.8	0.5 g.	27.2	20.5	19.2	22.5
March 20th	0.1 g.	5.8	5.0	6.3	6.4	0.5 g.	38.1	29.7	27.4	33.0
April 24th	0.1 g.	5.1	5 0	5.7	5.2	0.5 g.	34.2	31.9	32.4	33.8
May 26th	0.1 g.	6.4	6.8	6.5	6.7	0.5 g.	35.9	34.6	31.1	34.3
July 20th	0.1 g.	8.1	7.3	7.5	7.9	0.5 g.	30.0	33.8	33.0	32.8

5. N-fixation and Nitrification.

Month	Nitrogen assimilation (mgs. N. fixed)				Nitrification in Solution (mgs. N. as nitrate)				Nitrification in Soil (mgs. N. as nitrate)			
	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV	Plot I	Plot II	Plot III	Plot IV
1912												
Aug. 22nd	1.9	2.0	2.1	2.1	3.2	3.5	4.0	3.8	5.7	5.8	5.4	5.8
Sept. 18th .	2.2	1.9	2.2	2.0	3.8	4.1	4.0	4.2	5.3	6.8	5.9	6.2
Oct. 28th .	6.0	8.9	2.5	10.7	6.6	7.2	6.6	6.5	5.2	10.0	6.0	5.6
Nov. 23rd .	8.3	8.5	8.2	8.6	6.0	6.7	6.8	5.8	4.8	9.0	5.2	5.3
Dec. 30th .	10.2	9.8	4.8	9.6	8.0	9.3	8.8	9.0	5.0	8.6	5.1	5.1
1913												
Feb. 28th .	9.5	9.8	9.8	9.3	6.3	7.6	5.8	6.7	4.9	8.3	6.0	5.2
March 20th	9.8	9.4	9.4	9.9	8.8	8.0	7.1	7.4	6.0	5.8	7.1	5.7
April 24th .	2.4	2.4	2.4	2.1	6.4	6.4	6.1	6.0	6.6	7.0	6.4	6.4
May 26th .	10.3	11.0	10.2	11.0	4.5	4.7	4.7	4.7	6.6	7.4	6.3	6.4
July 20th .	10.0	6.9	10.6	9.7	3.1	3.5	3.3	4.6	6.4	6.0	6.2	6.4

2. Comparison of the results of manuring experiments in the field with those of laboratory tests indicates that the latter may be of considerable value in affording information as to the decomposition processes naturally occurring in soils. No difference, however, could be detected between soil from one half of the experimental area which had received autumn cultivation and soil from the other half which remained untouched until the spring ploughing, although the crop returns showed a 20 per cent superiority (in respect to nitrogen) in favour of autumn cultivation.

6. Plot yields and composition of crop.

Manure applied	Cultivated in Autumn					Untouched till Spring				
	crop per plot (Kilos.)	% dry matter	% N. in dry matter	% N. in crop	T. N. per plot (grams)	crop per plot (Kilos.)	% dry matter	% N. in dry matter	% N. in crop	T. N. per plot (grams)
Unmanured	34.0	20.5	1.39	0.285	97.0	32.5	20.9	1.15	0.241	78.5
	—	—	—	—	—	31.0	21.1	1.18	0.249	77.2
	34.5	21.2	1.31	0.278	96.0	32.5	21.6	1.24	0.268	87.0
	38.5	22.3	1.25	0.279	107	29.5	22.4	1.18	0.262	77.3
Nitrate of Soda	47.0	21.5	1.55	0.334	157	46.0	21.9	1.37	0.300	138
	48.0	20.4	1.66	0.339	163	48.5	20.3	1.44	0.292	142
	50.0	22.4	1.52	0.340	170	46.5	22.2	1.31	0.291	135
Sulphate of Ammonia	45.5	21.2	1.68	0.356	162	45.5	20.9	1.36	0.284	128
	46.0	22.1	1.47	0.325	150	46.5	21.8	1.31	0.286	133
	49.5	22.2	1.42	0.315	156	47.5	21.2	1.39	0.295	140
Cyanamide	41.0	20.1	1.56	0.314	128	45.5	22.1	1.28	0.284	129
	49.0	21.2	1.53	0.324	154	38.5	20.4	1.33	0.272	105
	49.0	21.4	1.49	0.319	156	48.0	21.2	1.38	0.292	140
Flesh meal. New	43.0	21.5	1.38	0.297	128	33.5	22.0	1.30	0.286	96
	37.0	20.7	1.55	0.321	118	38.5	21.8	1.30	0.284	109
Flesh meal. Old	37.0	21.1	1.47	0.310	112	40.5	22.0	1.23	0.271	110
	41.0	21.1	1.49	0.315	128	35.5	21.7	1.28	0.278	99
Blood meal. New	39.5	21.5	1.44	0.310	123	36.5	20.0	1.41	0.282	103
	42.0	21.1	1.46	0.308	129	40.5	21.4	1.34	0.287	115
	37.0	21.8	1.49	0.324	120	35.0	20.9	1.42	0.295	103
Blood meal. Old	37.0	21.3	1.43	0.305	113					
	39.0	22.0	1.37	0.301	111	—	—	—	—	—
	41.0	22.2	1.31	0.298	121					
Horn meal	36.5	20.8	1.43	0.298	106	38.5	21.0	1.33	0.279	107
	40.5	20.2	1.53	0.309	125	34.5	21.1	1.28	0.270	93
	38.0	21.7	1.47	0.320	119	36.5	21.3	1.28	0.273	100

3. It is regarded that "solution methods" of investigation are quite as valuable as methods in which the natural soil is used as medium. In so far as nitrification tests are concerned the solution method gave much clearer indications of seasonal variation. The failure of soil tests in this respect is attributed to the low proportion of chalk in the soil under investigation. A low chalk content may act as a limiting factor to nitrification in soil tests although not in the field. The seasonal variation in ammonification was shown rather more clearly in soil tests, but the differences are too small to serve as a basis for comparison of the two methods. Otherwise, parallel results were obtained by both methods. The greater simplicity of solution methods and the greater facility which synthetic solutions offer theoretically, in the direction of limiting the processes to be investigated, represent their chief claim to usefulness in bacteriological work.

7. Plot yields and composition of crop. Average data in round numbers.

Manure applied (N. per plot = 100 gms.)	Average crop in Kilos.		Average % N. in crop		Average total nitrogen in crop, in grams		Increase in total nitrogen = % N. of manure recovered	
	cultivat. in Autumn	untouch. till Spring	cultivat. in Autumn	untouch. till Spring	cutlivat. in Autumn	untouch. till Spring	cultivat. in Autumn	untouch. till Spring
Unmanured	35.7	31.4	0.281	0.255	100	80	—	—
Nitrate of soda	48.3	47.0	0.338	0.294	163	139	63	59
Sulphate of ammonia	47.0	46.5	0.332	0.288	156	134	56	54
Cyanamide	46.5	44.0	0.319	0.283	146	127	46	47
Flesh meal New sample	40.0	36.0	0.309	0.285	123	107	23	27
Flesh meal Original sample	39.0	38,0	0.312	0.275	120	104	20	24
Blood meal New sample	39.5	37.3	0.314	0.288	124	107	24	27
Blood meal Original sample	39.0	—	0.298	—	116	—	16	—
Horn meal	38.3	36.5	0.309	0.274	117	100	17	20

Nachdruck verboten.

Verlauf der Denitrifikation in Böden bei verschiedenem Wassergehalt.

[Mitteilung des Instituts für Agrikulturchemie und Bakteriologie der Kgl. Landw. Hochschule und der Agrikulturchemischen Versuchsstation Berlin.]

Von **O. Lemmermann** und **Jhr. L. Wichers.**

Berichterstatter: **Jhr. L. Wichers.**

Mit 1 Figur.

In einer Arbeit über „Bakteriologisch-chemische Untersuchungen“ (Landw. Jahrb. 1909. p. 319) wies O. Lemmermann darauf hin, daß die Denitrifikation in Nährlösungen ganz anders verlaufen kann, als in natürlichem Boden. Er schrieb darin p. 320: „Wenn man eine spezifische Nährlösung, wie z. B. die Giltaysche Lösung, mit Boden impft, wird man fast stets eine Denitrifikation, d. h. also eine Zerstörung des Salpetermoleküls unter Abspaltung von elementarem Stickstoff konstatieren können, und zwar wird unter solchen Verhältnissen fast sämtlicher Salpeter in dieser Weise zersetzt und nur ein geringer Teil wird in anderer Weise, und zwar in Eiweißstickstoff umgewandelt. Diese Zersetzungsvorgänge ändern sich oft schon, wenn man nicht mit Flüssigkeiten arbeitet, sondern mit Sand, den man mit Nährlösungen getränkt hat. Und wenn man die Salpeterzersetzung schließlich im natürlichen Boden verfolgt, dann kann man oft finden, daß selbst unter für das Zustandekommen der Denitrifikation günstigen Verhältnissen aus dem umgewandelten Salpeterstickstoff nur ein geringer Teil in freien, elementaren Stickstoff, der größte Teil in Eiweißstickstoff umgewandelt ist.“

Koch und Pettit (Koch, Mitt. d. D. L. G. 19. März 1910. p. 173. — Koch und Pettit, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. 1910. p. 335) haben dann später die Beobachtungen Lemmermanns bestätigen können, indem sie die Denitrifikation im Boden auch bei höherem Wassergehalt, wodurch also der Boden einer Flüssigkeit ähnlicher gemacht wurde, verfolgten und fanden, daß beim Überschreiten einer gewissen Feuchtigkeitsgrenze des Bodens, die Denitrifikation, d. h. die Entbindung von elementarem Stickstoff aus dem Salpetermolekül, plötzlich einsetzt und sogar bis zu 82 Proz. des gegebenen Salpeterstickstoffs steigen kann. Sie erklären diese Tatsache dahin, daß die hohe Bodenfeuchtigkeit den Luftzutritt zum Boden einschränkt und so die Denitrifikationsbakterien verhindert, ihr Sauerstoffbedürfnis aus der Luft zu decken. Sie entnehmen ihn unter solchen Verhältnissen dem Salpeter und zerstören dadurch das Salpetermolekül unter Entbindung von elementarem Stickstoff. Ebenso wie hohe Feuchtigkeit wird auch erschwerte Lüftung des Bodens infolge mangelhafter Bearbeitung und Lockerung desselben (nach starken Regengüssen) Stickstoffverluste durch Salpeterzersetzung bewirken können. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, daß die salpeterumsetzenden Bakterien überraschend fein auf einen bestimmten Wassergehalt des Bodens reagieren.

Auch andere Forscher kamen bei ihren Untersuchungen zu ähnlichen Resultaten, insofern sie fanden, daß sich verschiedene bakteriologische Vorgänge im Boden anders abspielen als in Flüssigkeiten. So haben Bazarewski (Beiträge zur Kenntnis der Nitrifikation und Denitrifikation im Boden. Inaug.-Diss. Göttingen 1906) und Coleman (Untersuchungen über Nitrifikation. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20. p. 401) gezeigt, daß die salpeterbildenden Bakterien im Boden viel weniger empfindlich gegen gelöste organische Substanzen sind wie in Flüssigkeiten, und daß im Boden und Sand geringe Mengen solcher organischer Substanzen die Salpeterbildung sogar steigern. Lemmermann und seine Mitarbeiter (zitiert nach Lemmermann, Landw. Jahrb. Bd. 38. 1909. p. 321) konnten bei der Nitrifikation solche Unterschiede nicht konstatieren, dagegen verlief die Fäulnis in Flüssigkeitskulturen wesentlich anders als in natürlichem Boden. Weiter hat sich bei neueren Untersuchungen ergeben, daß der Charakter der Nährlösung von größerer Bedeutung sein kann, als der zum Impfen benutzte Boden. Buhlert und Fickendey (Centralbl. f. Bakt. Bd. 16. No. 10—13) konstatierten bei ihren Versuchen, daß durch Bearbeitung gut durchlüftete Erden im Nährsubstrat eine energischere Denitrifikation erzeugen, als Erden, welche bisher brach lagen, man dürfe daraus aber deshalb noch nicht den Schluß ziehen, daß in einem bearbeiteten Felde der Verlust von Salpeter größer sein müsse als in einem nicht bearbeiteten. Bei Durchlüftung des Erdbodens entwickeln sich besonders diejenigen aëroben Mikroorganismen, welche bei veränderten Bedingungen ihren Bedarf an Sauerstoff auf Kosten des Salpeters decken. Stoklasa (Centralbl. f. Bakt. Bd. 17. No. 1—2) behauptet sogar, daß die die Nitrate bis zu freiem Stickstoff zerstörenden Organismen wirklich aërob sind und daß ihre Entwicklung ohne Sauerstoff in nitratlosem Substrat unmöglich ist. Nach Sewerin

(Centralbl. f. Bakt. Bd. 22. 1909. p. 348) ist diese Behauptung Stoklasas nicht ohne Ausnahme, denn er fand bei seinen Versuchen, daß der fakultativ-aërobe Bac. pyocyaneus ausgezeichnete Entwicklung in Fleischpeptonbouillon bei Abwesenheit von Sauerstoff und Nitrat zeigte. Auch der Bac. actinopelte Baur kann ebenfalls anaërob ohne Nitrat wachsen. Ferner konnte Sewerin bei V. denitrificans und Bac. pyocyaneus feststellen, daß völlige Abwesenheit des Luftsauerstoffs mit Ersatz desselben durch Wasserstoff, die Reduktionskraft der beiden Organismen bedeutend erhöhte. Bei Stutzer und Burri zeigten unter diesen Verhältnissen B. coli + V. denitrificans keine N-Bildung, während bei van Itterson (Ref.: Centralbl. f. Bakt. Bd. 9. 1902) der B. vulpinus sich ohne Sauerstoff in Nitratlösung gar nicht entwickelte. Egunoff konnte dann für seinen Denitrifikator konstatieren, daß dieser unter anaëroben Bedingungen energisch Nitrat zerstört, doch nebenbei unter solchen Bedingungen allmählich ausartet; das Wachstum wurde gehemmt.

Es ist aus den hier angeführten Angaben zur Genüge ersichtlich, daß die Denitrifikatoren in bedeutender Mehrzahl aërobe sind, der von ihnen erregte Denitrifikationsprozeß aber ein mehr oder weniger anaërober ist.

Durch reichlichen Luftzutritt wurde zuweilen die Denitrifikation ganz aufgehoben, oft nur gehemmt oder gar nicht beeinflußt. Lemmermann (Kritische Studien über Denitrifikationsvorgänge. Jena 1900) hat bereits auf die Gründe für diese voneinander abweichenden Angaben hingewiesen, nämlich, daß einmal die verschiedene Art der Versuchsanstellung, sodann aber auch die Artverschiedenheit der Denitrifikationsbakterien eine verschiedene Wirkung des Sauerstoffs bedingen kann. Behn (Die Denitrifikation. Berlin 1906) kommt zu der Schlußfolgerung, daß, wenn man Abweichungen in der Größe der Sauerstoffwirkung der artlichen Verschiedenheit zugute hält, doch die Tatsache bestehen bleibt, daß fast in allen Fällen unter verschiedenen Bedingungen und bei den verschiedensten Organismen die Wirkung des Sauerstoffs in gleicher Richtung liegt. Auch von Caron (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. 1912. p. 62) kommt zu einem ähnlichen Endresultat, indem er bei der Zusammenfassung seiner Arbeit sagt: „Die verschiedensten denitrifizierenden Organismen scheinen sich hinsichtlich der Wirkung des Sauerstoffabschlusses gleich zu verhalten, da außer bei Mischkulturen auch bei den Reinkulturen der stärksten Repräsentanten der Denitrifikatoren (B. pyocyaneus und B. fluorescens) in Erde erhebliche Stickstoffverluste eintreten. Gleichzeitig mit der Zunahme des Luftzutritts findet auch ein Wachsen der Eiweißbildung statt, die ihrerseits wieder eine Steigerung des Verbrauches an Energiematerial hervorruft, da zum Eiweißaufbau auch Energiematerial notwendig ist.“

Es ist sehr gut möglich, wie es Sewerin (l. c. p. 356) ausdrückt, daß der anaërobe Prozeß der aëroben Natur der Denitrifikatoren zuwider ist; dieser Prozeß ist ein gezwungener unter dem Einfluß eines gewissen Sauerstoffmangels, und deswegen muß er für jene gewissermaßen ein künstlicher, physiologisch unnormaler Prozeß sein. Bei gut durchlüfteten Erdböden wird energische Vermehrung der Denitrifikatoren, aber dagegen schwache Bewährung ihrer Denitrifikationsfunktion stattfinden; umgekehrt werden bei schlecht durchlüfteten Erdböden, schwache Vermehrung, aber Steigerung der Denitrifikationstätigkeit in den Vordergrund treten.

Da also der Feuchtigkeitsgehalt der Böden für die Art des Verlaufes der Salpeterumwandlung von ausschlaggebender Bedeutung ist, kam es uns darauf an, durch vergleichende Untersuchungen festzustellen, wie sich verschiedene Böden bei verschiedenem Wassergehalt in dieser Beziehung verhalten.

Während Koch und Pettit die Feuchtigkeit des Bodens in Prozenten der Trockensubstanz ausdrücken, haben wir dieselbe bezogen auf die Wasserkapazität des Bodens, um so einen besseren Vergleichsmaßstab für die verschiedenen Böden zu gewinnen.

Es wurden drei Böden zu den Versuchen herangezogen, die in ihren physikalischen Eigenschaften und vor allen Dingen in ihrem Verhalten zur Wasserabsorption voneinander abwichen, und zwar ein leichter Sandboden (Dahlemerde) und zwei humusreichere Böden, die mit den Namen Prüfer- und Rettgauerde bezeichnet werden sollen.

Die Bestimmung der wasserhaltenden Kraft dieser drei Böden geschah nach den Angaben in König[1]) und ergab, daß:

1 kg Dahlemerde mit 0,4% Wasser, im ganzen 300 ccm,
1 kg Prüfererde „ 10,9% „ „ „ 260 ccm und
1 kg Rettgauerde „ 14,7% „ „ „ 350 ccm Wasser

absorbieren konnte.

Auf gleiche Mengen, und zwar auf 1 kg Trockensubstanz umgerechnet, ergibt dies für:

Dahlemerde eine Wasserabsorption von 305 ccm,
Prüfererde „ „ „ 414 ccm und
Rettgauerde „ „ „ 582,5 ccm.

Die Versuche wurden nun in der Weise angestellt, daß die Böden mit einem Wasserzusatz versehen wurden, der 100 resp. 75, 50 und 25 Proz. ihrer Wasserkapazität entsprach.

Außerdem erhielten die Gefäße in vier Versuchsreihen auf 1 kg feuchte Erde, 5 g Dextrose und 1,518 g $NaNO_3$, um die Umwandlung des Salpeters bei dem verschiedenen Wassergehalt zu beobachten. Wir nahmen dasselbe Mengenverhältnis zwischen Dextrose und Nitrat, wie es sich bei den Koch- und Pettitschen Versuchen als das günstigste erwiesen hat. Genannte Autoren fanden nämlich, daß mit steigenden Dextrosegaben zwar auch immer steigende Nitratmengen verschwinden, auf die Einheit Dextrose berechnet aber sinkt mit steigender Dextrosemenge diejenige des umgesetzten Nitrats. Die Bakterien treiben also um so stärkeren Luxus mit dem Zucker, je mehr ihnen davon zur Verfügung steht. Auch die Eiweißbildung fand ihr Maximum bei einer Dextrosegabe von 569 mg pro 100 g trockener Erde (ca. 5 g pro Kilogramm) und einer Salpeterdüngung von 23 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde. Durch Erhöhung der Salpetergabe auf 55 mg oder 110 mg N pro 100 g trockener Erde wurde ebensoviel Eiweiß gebildet, wie wenn 23 mg zur Verfügung standen.

Ferner war für uns die Konzentration von ca. 0,15 Proz. $NaNO_3$ (entsprechend ca. 25 mg N pro 100 g trockener Erde) aus dem Grunde die günstigste, weil wir beabsichtigten, den Nitratstickstoffgehalt nach der alkalischen Reduktionsmethode zu bestimmen und diese Methode sich nach früheren Untersuchungen (Seydel und Wichers, Zeitschr. f. angew. Chem. XXIV. 1911. p. 2046) bei einer Bestimmungskonzentration von 15—30 mg Nitratstickstoff als eine sehr genaue und zuverlässige erwiesen hat.

In einer Versuchsreihe blieben die Gefäße ohne Dextrose- und Salpeter-

---

[1]) König, Unters. landw. u. gewerbl. wichtiger Stoffe. 1906.

Tabelle I. Die bei Beginn des Versuches vorhandenen Nitrat- und Ge-

	in Dahlemerde							
	Nitrat-N				Gesamt-N			
	Einzelne Bestimmungen	Mittel	Nitrat-N gefunden	Nitrat-N berechnet	Einzelne Bestimmungen	Mittel	Nitrat-N gefunden	Nitrat-N berechnet
1 kg Erde ohne Zusatz	2,69 2,71 2,78 2,81 2,69 2,78	2,74	—	—	64,47 65,12 64,47 66,09 66,74 65,12	65,34 ± 0,31	—	—
1 kg Erde + 5 g Dextrose + 1,518 g $NaNO_3$	27,31 27,50 26,65 27,18 27,37 27,04	27,18	24,44	24,61	89,97 90,29 90,62 89,01 89,97 88,69 90,29	89,84 ± 0,18	24,5	24,61

gabe, um die Veränderungen des natürlichen Salpetergehaltes kontrollieren zu können.

Der Versuchsplan gestaltete sich demnach folgendermaßen:

I. 3 Gefäße je mit 1 kg Erde ohne weiteren Zusatz (Kontrolle), mit einem Wasserzusatz von 50% der Wasserkapazität.

II. 3 Gefäße je mit 1 kg Erde + 5 g Dextrose + 1,518 g $NaNO_3$, mit einem Wasserzusatz von 100% der H_2O-Kapazität.

III. 3 Gefäße je mit 1 kg Erde + 5 g Dextrose + 1,518 g $NaNO_3$, mit einem Wasserzusatz von 75% der H_2O-Kapazität.

IV. 3 Gefäße je mit 1 kg Erde + 5 g Dextrose + 1,518 g $NaNO_3$, mit einem Wasserzusatz von 50% der H_2O-Kapazität.

V. 3 Gefäße je mit 1 kg Erde + 5 g Dextrose + 1,518 g $NaNO_3$, mit einem Wasserzusatz von 25% der H_2O-Kapazität.

Die Kontrollgefäße wurden deshalb auf 50 Proz. der Wasserkapazität gehalten, weil aus vorangegangenen Untersuchungen festgestellt werden konnte, daß bei diesen Wassermengen die Böden, die günstigste Feuchtigkeit aufwiesen.

Als Gefäße dienten emaillierte Blechgefäße von 7,5 cm Höhe und 20 cm Durchmesser, wie sie seit langem in dem Berliner Institut benutzt werden und sich bewährt haben. Sie bieten die Möglichkeit, die Erde nach Abbrechen der Versuche gleich in denselben mit Weinsäure zu versetzen und zu trocknen. Da sie mit einem durchlöcherten Deckel versehen sind, gestatten sie eine gute Durchlüftung, ohne die Feuchtigkeit allzusehr verdunsten zu lassen.

Die Gefäße wurden alle auf einem Regal in einem gleichmäßig erwärmten Raum aufgestellt und so während eines Monats stehen gelassen. Jeden zweiten

samtstickstoffmengen in Milligramm pro 100 g absolut trockener Erde.

in Prüfererde								in Rettgauerde							
Nitrat-N				Gesamt-N				Nitrat-N				Gesamt-N			
Einzelne Bestimmungen	Mittel	Nitrat-N gefunden	Nitrat-N berechnet	Einzelne Bestimmungen	Mittel	Nitrat-N gefunden	Nitrat-N berechnet	Einzelne Bestimmungen	Mittel	Nitrat-N gefunden	Nitrat-N berechnet	Einzelne Bestimmungen	Mittel	Nitrat-N gefunden	Nitrat-N berechnet
				222,3								229,1			
3,85				221,1				3,86				229,7			
				220,8								229,4			
3,92	3,92	—	—	223,1	222,9	—	—	3,66	3,79	—	—	228,8	229,9	—	—
				223,4	± 0,35							230,6	± 0,23		
				222,5								229,7			
3,95				224,9				3,86				230,9			
				224,6								231,5			
				252,2								259,6			
31,94				251,6				33,89				257,8			
				252,5								256,7			
32,27	32,34	28,42	28,22	254,2	252,7	29,8	28,22	33,89	34,03	30,24	29,46	257,0	258,1	28,2	29,46
				252,8	± 0,22							258,4	± 0,27		
				251,9								259,3			
32,73				253,0				34,30				257,2			
				253,9								259,0			

bis dritten Tag wurden sämtliche Gefäße durch Wiegen und Ergänzen des verdunsteten Wassers auf ihr ursprüngliches Gewicht zurückgebracht.

Nach Verlauf eines Monats wurde die Erde aller Gefäße mit einer 2-proz. Weinsäurelösung angesäuert, getrocknet und nach dem völligen Trocknen möglichst fein gemahlen, worauf sie dann auf Nitrat- und Gesamtstickstoff untersucht wurde. Gleich bei der Anstellung der Versuchsreihen wurden ebenfalls Proben der Böden mit und ohne Nitratzusatz auf Nitrat- und Gesamtstickstoff untersucht; erstens, um die bei Beginn des Versuches in der Erde vorhandenen Stickstoffmengen festzustellen und zweitens, um die Genauigkeit der Bestimmungsmethoden zu kontrollieren.

Die Methode der Nitratbestimmung in alkalischer Lösung wurde so ausgeführt, wie sie in der oben erwähnten Arbeit beschrieben ist, und es genügt deshalb darauf hinzuweisen. Nur dürfte hier nicht unerwähnt bleiben, daß wir jedesmal 500 g Erde mit 1 l Wasser extrahierten und vom Extrakt zwei, wenn möglich drei Portionen à 250 ccm (entsprechend 100—125 g Erde) zur Bestimmung entnahmen.

Zur Gesamtstickstoffbestimmung wurden 25 g Erde mit 30 ccm 6-proz. Salicylschwefelsäure versetzt, hierauf mit Natriumthiosulfat reduziert, dann 50 ccm konzentrierte Schwefelsäure, ein Tropfen Quecksilber und ein Löffel voll Kaliumsulfat zugesetzt und aufgeschlossen. Dann wurde mit Wasser verdünnt, in Destillierkolben übergespült, ein reichlicher Überschuß von Schwefelkalilauge mit etwas Zinkspänen zugesetzt und der Ammoniak in n/10 Schwefelsäure überdestilliert.

Die Ergebnisse der Ausgangsanalysen sind in folgender Tabelle I zusammengefaßt. Wir sehen hier, daß die zugesetzten Mengen Stickstoff in

Tabelle II. Nitrat- und Gesamtstickstoffbestimmungen

No. der Gefäße mit % Wasserkapazität	Parallelgefäße	Dahlemerde						Prüfer		
		Nitrat-N			Gesamt-N			Nitrat-N		
		ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde
		a	b	c	d	f	g	h	k	l
50%	a	5,6 5,5 5,8	5,7	3,67	20,1 20,4 20,3 20,5 20,6	20,7	66,33 ± 0,2 [1]	9,0 9,4	9,2	5,14
I	b	6,1 5,8 5,9			21,2 20,7 20,9 20,7 21,0			8,8 9,1		
Kontrolle	c	5,5 5,6 5,6			20,7 20,8 21,0 20,9 20,8			9,6 9,4		
100%	a	0,1 0,2	0,1	0,06	20,7 21,3 21,7 21,5 21,4	21,3	68,31 ± 0,179	39,2 39,3	36,9	20,37
II	b	0,0 0,2			21,3 21,5 21,3 20,7 21,0			40,1 39,9		
	c	0,2 0,0			21,2 21,5 21,5 21,7 20,9			31,4 31,6		
75%	a	26,1 25,9	24,3	15,66	27,4 25,9 27,2 28,3 27,6	27,1	86,99 ± 0,465	36,8 36,7	38,5	21,45
III	b	23,2 22,0			27,4 26,7 26,3 26,8 27,5			40,0 39,7		

---

[1] Die wahrscheinlichen Fehler wurden aus den bei den einzelnen Bestimmungen erhaltenen
Tabelle vielleicht irrtümlicherweise schließen würde, aus der Anzahl Kubikzentimeter n/20 H_2SO_4

nach Abschluß der Denitrifikationsversuche.

erde			Rettgauerde					
Gesamt-N			Nitrat-N			Gesamt-N		
ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde
m	n	o	p	r	s	t	u	w
82,45						81,0		
83,05			10,4			80,7		
82,85						81,2		
81,45			10,3			81,3		
82,55						81,5		
82,75						80,7		
82,35			10,7			80,4		
82,35	82,46	227,5		10,5	6,12	80,9	81,2	231,2
82,95		± **0,294**	10,4			81,2		± **0,354**
82,15						81,4		
81,75						81,3		
82,45			10,7			81,7		
83,15						82,2		
82,15			10,5			81,8		
82,45						81,7		
88,8						84,8		
89,0			3,5			84,9		
89,5						84,6		
89,3			—			85,1		
88,9						83,6		
88,2						88,4		
88,9			32,3			89,5		
87,3	88,1	241,6		36,3	20,73	89,5	90,0	252,6
89,3		± **0,492**	31,5			89,3		± **0,499**
87,8						89,7		
86,4						91,2		
87,1			40,9			90,5		
86,6						90,6		
87,4			40,3			90,0		
87,2						90,8		
89,5						90,7		
89,1			46,5			90,5		
89,3						90,4		
88,9			46,1			91,4		
—						90,6		
88,9						90,1		
89,6			46,5			90,2		
90,1	89,7	247,9		46,2	26,93	90,2	90,5	257,5
89,8		± **0,314**	46,5			89,8		± **0,227**
89,9						90,7		

Gewichtsmengen Stickstoff pro 100 g trockene Erde berechnet. Sie sind also nicht, wie man aus der der einzelnen Bestimmungen berechnet.

Tabelle II

		Dahlemerde						Prüfer		
		Nitrat-N			Gesamt-N			Nitrat-N		
No. der Gefäße mit % Wasserkapazität	Parallelgefäße	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde
		a	b	c	d	f	g	h	k	l
	c	**1,9** **1,8**			**22,8** **22,2** **23,2** **21,3** —			39,2 38,8		
50%	a	31,9 31,7 32,1	31,9	20,52	26,8 28,3 27,4 28,0 28,0	27,9	89,43 ± 0,34	39,9 39,4	39,6	22,03
IV	b	32,2 32,1 32,1			27,3 28,3 28,4 27,8 28,3			39,7 39,0		
	c	31,1 32,0 32,2			28,3 27,9 28,1 27,1 28,0			39,5 39,9		
25%	a	28,3 29,8 29,7	29,8	19,16	27,2 25,7 27,2 27,5 27,2	26,9	86,20 ± 0,399	37,9 37,7	37,8	21,10
V	b	30,4 30,8 31,0			27,7 27,3 27,5 27,5 27,5			37,5 37,3		
	c	29,1 29,5 29,5			27,8 27,7 26,3 25,9 26,2			38,1 38,5		

Form von $NaNO_3$ ziemlich genau wiedergefunden wurden. Nur bei den Gesamtstickstoffbestimmungen bei Prüfer- und Rettgauerde sind die Differenzen der gefundenen Zahlen mit den berechneten etwas größer als 1 mg.

In Tabelle II sind alle Resultate der Nitrat- und Gesamtstickstoffbestimmungen nach Abschluß der Denitrifikationsversuche wiedergegeben.

Sehr merkwürdig sind die beiden Fehlversuche III c bei Dahlemerde

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

(Fortsetzung).

erde			Rettgauerde					
Gesamt-N			Nitrat-N			Gesamt-N		
ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde	ccm n/20 H_2SO_4 von NH_3 neutralisiert	Mittel	Entspricht mg N pro 100 g trockener Erde
m	n	o	p	r	s	t	u	w
90,4						90,9		
91,3			45,7			89,9		
90,5						91,2		
89,9			46,1			90,7		
—						90,7		
90,2	90,4	249,2 ± 0,255		45,95	26,65	88,75	88,83	253,9 ± 0,213
90,2			46,1			88,95		
89,6						88,65		
90,1			46,0			88,95		
—						89,05		
89,2						88,65		
90,9			46,6			88,75		
90,6						88,35		
90,5			45,7			88,25		
—						88,15		
90,7						89,05		
90,2			46,0			88,55		
90,9						89,85		
90,9			45,3			88,95		
91,0						89,55		
88,7	89,1	246,0 ± 0,265		45,45	26,42	88,65	87,68	250,5 ± 0,364
89,3			45,0			88,15		
88,3						87,75		
88,8			45,4			88,55		
88,3						88,45		
88,9						86,45		
90,0			45,4			87,65		
89,4						88,45		
89,0			44,4			86,75		
89,5						87,75		
89,3						86,55		
89,5			46,3			86,55		
89,4						87,75		
88,0			46,2			87,75		
89,5						87.95		

und II a bei Rettgauerde, die viel weniger an Nitrat- und Gesamtstickstoff enthalten wie die entsprechenden Parallelgefäße. Es beruht das sehr wahrscheinlich darauf, daß hier etwas mehr Wasser als die berechneten Mengen zugesetzt worden ist.

Daß diese Annahme große Wahrscheinlichkeit hat, zeigen uns folgende Versuche, welche mit Dahlem- und Rettgauerde angestellt wurden.

Die Ausführung der Versuchsreihe geschah genau so wie vorhin, ebenso waren die Mengenverhältnisse zwischen Erde, Nitrat und Zucker dieselben, nur wurden die Wassermengen anders gewählt, und zwar gestaltete sich der Versuchsplan mit Dahlemerde wie folgt:

Gefäß 1,2—500 g Erde ohne Zusatz, mit einem Wassergehalt von 50% der Wasserkapazität.

Gefäß 3,4—500 g Erde + 0,759 g $NaNO_3$ + 2,5 g Dextrose, mit 75% der vollen Wasserkapazität.

Gefäß 5,6—500 g Erde + 0,759 g $NaNO_3$ + 2,5 g Dextrose, mit 85% der vollen Wasserkapazität.

Gefäß 7,8—500 g Erde + 0,759 g $NaNO_3$ + 2,5 g Dextrose, mit 95% der vollen Wasserkapazität.

Und mit Rettgauerde wie folgt:

Gefäß 1,2—500 g Erde ohne Zusatz, mit einem Wassergehalt von 50% der vollen Wasserkapazität.

Gefäß 3,4—500 g Erde + 0,759 g $NaNO_3$ + 2,5 g Dextrose, mit einem Wassergehalt von 100% der vollen Wasserkapazität.

Gefäß 5,6—500 g Erde + 0,759 g $NaNO_3$ + 2,5 g Dextrose, mit einem Wassergehalt von 150% der vollen Wasserkapazität.

Die Gefäße wurden wiederum in denselben Raum aufgestellt und nach einem Monat auf Nitrat- und Gesamtstickstoff untersucht.

Es seien hierunter die analytischen Befunde mitgeteilt. (S. Tab. IIa.)

Wir sehen aus diesen Zahlen, daß vor allem bei Dahlemerde eine Steigerung des Wassergehaltes von 75 auf 85 Proz. der Wasserkapazität schon ein fast vollständige Denitrifikation hervorgerufen hat. Während bei 75 Proz. der Wasserkapazität noch 17,3 mg Nitrat-N wiedergefunden wurden (bei der ersten Versuchsreihe [Tabelle II] waren es als Mittel aus den beiden übrigen Gefäßen ca. 15,7 mg), waren bei 85 Proz. der Wasserkapazität nur noch 1,40 mg Nitrat-N nachzuweisen, welche Menge bei einem Wassergehalt von 95 Proz. der Wasserkapazität nicht wesentlich änderte.

Die Grenze liegt bei Dahlemerde also zwischen einem Wassergehalt von 75 und 85 Proz. der Wasserkapazität, also ganz nahe an 75 Proz.

Bei Rettgauerde sind allerdings die Ergebnisse weniger beweiskräftig, weil hier die Grenze, wo vollständige Denitrifikation eintritt, ebensogut ganz nahe an 150 Proz. als an 100 Proz. der Wasserkapazität liegen kann. Der Versuch hat aber jedenfalls gezeigt, daß bei Rettgauerde, wenn eben die Bedingungen so gewählt werden, daß die Erdkulturen einer Flüssigkeitskultur ähnlich werden, das Nitrat ebenfalls vollständig zerstört wird.

Es darf hiernach wohl berechtigt sein, die abweichenden Zahlen in Tabelle II bei der Berechnung der Mittelwerten außer Betracht zu lassen. Im übrigen stimmen die analytischen Befunde im allgemeinen sehr befriedigend überein.

Einen besseren Überblick über die während der Versuchsdauer entstandenen Stickstoffumwandlungen in den drei Böden bei verschiedenem Wassergehalt gewähren uns die Tabellen III und IV.

In Tabelle III sind nur die gefundenen Mittelwerte und die Verluste an Nitrat- und Gesamt-N wiedergegeben.

Tabelle IV zeigt uns, in welcher Form die an Nitrat verloren gegangene Menge Stickstoff umgewandelt worden ist. In der ersten Spalte jeder Versuchsreihe finden wir den Gesamt-Nitratstickstoffverlust ausgedrückt in Milligramm und Prozenten des ursprünglich vorhandenen Nitrats. In der zweiten Spalte, die bei der Umwandlung entstandenen Mengen elementaren Stickstoff, und in der dritten Spalte, der aus dem Nitrat entstandene Eiweißstickstoff.

Tabelle II a.

Wasserkapazität %		Dahlem						
		Nitratstickstoff				Gesamtstickstoff		
		mg N pro 100 g trockener Erde	Mittel	Verlust in mg	Verlust in % des Nitrat-N	mg N pro 100 g trockener Erde	Mittel	Verlust in mg
	Bei Beginn des Versuches vorhanden:							
	Erde ohne Zusatz . . .	2,91 2,89	2,90	—	—	—	41,28	—
	Erde + $NaNO_3$-Zusatz .	28,54 28,56	28,55	—	—	—	66,94	—
	Am Schluß des Versuches vorhanden:							
50	Erde ohne Zusatz . . .	2,86 3,03	2,95	—	—	—	47,62	+ 6,34
75	Erde + $NaNO_3$ + Dextrose	17,24 17,43	17,34	11,22	39,3	—	70,25	+ 3,31
85	Erde + $NaNO_3$ + Dextrose	1,98 0,82	1,40	27,16	95,1	—	56,53	— 10,41
95	Erde + $NaNO_3$ + Dextrose	1,02 0,92	0,98	27,58	96,6	—	55,98	— 10,96
		Rettgau						
	Bei Beginn des Versuches vorhanden:							
	Erde ohne Zusatz . . .	5,92 6,04	5,98	—	—	—	219,2	—
	Erde + $NaNO_3$-Zusatz .	31,60 31,68	31,64	—	—	—	244,86	—
	Am Schluß des Versuches vorhanden:							
50	Erde ohne Zusatz . . .	5,18 5,27	5,23	—	—	—	225,3	+ 6,1
100	Erde + $NaNO_3$ + Dextrose	19,24 18,17	18,70	12,94	40,9	—	244,28	— 0,58
150	Erde + $NaNO_3$ + Dextrose	0,96 1,02	0,99	30,65	96,9	—	231,35	— 13,51

Tabelle III.

Pro 100 g absolut trockener Erde		Dahlemerde				Prüfererde				Rettgauerde			
		Nitrat-N mg	Verlust mg	Ges.-N mg	Verlust mg	Nitrat-N mg	Verlust mg	Ges.-N mg	Verlust mg	Nitrat-N mg	Verlust mg	Ges.-N mg	Verlust mg
Bei Beginn des Versuches vorhanden		27,18	—	89,8	—	32,34	—	252,7	—	34,03	—	258,1	—
Am Schluß des Versuches vorhanden:													
Wasserkapazität	100%	0,06	**27,1**	68,3	**21,5**	20,37	**12,0**	241,6	**11,1**	20,73	**13,3**	252,6	**5,5**
	75%	15,66	**11,5**	87,0	**2,8**	21,45	**10,9**	247,8	**4,9**	26,90	**7,1**	257,5	**0,6**
	50%	20,52	**6,6**	89,4	**0,4**	22,03	**10,3**	249,2	**3,5**	26,65	**7,4**	253,9	**4,2**
	25%	19,16	**8,0**	86,2	**3,6**	21,10	**11,2**	246,0	**6,7**	26,40	**7,6**	250,5	**7,6**

Tabelle IV.
Von der vorhandenen Menge Nitratstickstoff sind also pro 100 g trockener Erde bei:

Wasserkapazität	Dahlem = 27,18 mg						Prüfer = 32,34 mg						Rettgau = 34,03 mg					
	Verloren gegangen		Umgewandelt in:				Verloren gegangen		Umgewandelt in:				Verloren gegangen		Umgewandelt in:			
			Elementar-N		Eiweiß-N.				Elementar-N		Eiweiß-N				Elementar-N		Eiweiß-N	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
100%	27,1	**99,7**	21,5	**79,1**	5,6	**20,6**	12,0	**37,1**	11,1	**34,3**	0,9	**2,8**	13,3	**39,08**	5,5	**16,18**	7,8	**22,9**
75%	11,5	**42,3**	2,8	**10,3**	8,7	**32,0**	10,9	**33,7**	4,9	**15,2**	6,0	**18,5**	7,1	**20,86**	0,6	**1,8**	6,5	**19,06**
50%	6,6	**24,3**	0,4	**1,5**	6,2	**22,8**	10,3	**31,9**	3,5	**10,8**	6,8	**21,1**	7,4	**21,8**	4,2	**12,3**	3,2	**9,5**
25%	8,0	**29,4**	3,6	**13,3**	4,4	**16,2**	11,2	**34,6**	6,7	**20,7**	4,5	**13,9**	7,6	**22,3**	7,6	**22,3**	0	**0**

Betrachten wir die Tabelle bezüglich des Verhaltens der drei Böden bei den verschiedenen Wassermengen, so hat bei dem Dahlemer Boden mit der geringsten Wasserkapazität die volle Wasserkapazität am schädlichsten gewirkt. Hier sind 99,7 Proz. des gebotenen Nitratstickstoffs umgewandelt, und zwar 79,1 Proz. in elementarem N und 20,6 Proz. in Eiweiß-N. Dies ist nur der einzige Fall, wo eine fast vollständige Denitrifikation stattgefunden hat. Bedeutend geringer ist die Umwandlung des Salpeterstickstoffs bei der vollen Wasserkapazität bei Prüfererde (37,1 Proz., wovon 34,3 Proz. in Eelmentar-N und 2,8 Proz. in Eiweiß-N) und bei Rettgauerde (39,08 Proz., wovon 16,18 Proz. in Elementar-N und 22,9 Proz. in Eiweiß-N). Offenbar ist also die Durchlüftung bei Dahlemerde mit 100 Proz. der vollen Wasserkapazität am meisten herabgesetzt worden.

Hiermit im Einklang steht die Beobachtung, die wir gelegentlich der Versuchsanstellung machen konnten. Es zeigte sich, daß das Volumen des Dahlemer Bodens beim Zusatz des Wassers abnahm. Die Erdpartikelchen schlossen sich enger aneinander und der Boden erhielt dadurch eine viel festere Konsistenz. Beim Aufgießen des Wassers wurde zuerst das Wasser gleich von der oberen Erdschicht aufgesaugt, dann aber ging das Eindringen des Wassers in der Erde immer langsamer vor sich, weil nun allmählich die obere Erdschicht undurchläßlich und dadurch das weitere Eindringen des Wassers in die tieferen Schichten bedeutend erschwert wurde, so daß die Flüssigkeit eine ganze Zeit über der Erde stehen blieb.

Ganz anders verhielt sich der Rettgauboden. Hier wurde das Wasser bis auf den letzten Tropfen sofort von der Erde aufgesaugt und die Erde behielt dabei das Aussehen, als wäre sie noch lange nicht mit Wasser gesättigt. Hand in Hand mit dem Zusetzen des Wassers dehnte sich das Erdvolumen aus.

Es soll hier an einem Beispiel gezeigt werden, wie verschieden die Erdvolumina bei den verschiedenen Wassermengen sein können.

Die Höhe der Erdschicht bei Dahlemerde war bei gleicher Oberfläche bei einem Wasserzusatz von 50 Proz. der Wasserkapazität um etwa 0,3 bis 0,5 cm größer als die Höhe der gleichen Erdmenge bei einer Feuchtigkeit von 100 Proz. der vollen Wasserkapazität. Andererseits war die Höhe der Erdschicht bei gleichen Mengen Rettgauerde und gleicher Oberfläche bei einer Feuchtigkeit von 50 Proz. ca. 0,5—1 cm geringer als bei 100 Proz. Wasserkapazität.

Hieraus geht hervor, daß der Rettgauboden sich bei ganz hoher Feuchtigkeit weit günstiger verhält als der Dahlemboden. Hier kann durch das Eindringen des Wassers und die damit parallel gehende Ausdehnung des Bodens leichter Luft in das Innere der Erde aufgenommen werden, während bei der Dahlemerde viel eher die Luft beim Wasserzusatz herausgetrieben wird.

Unter solchen Bedingungen werden sich sehr wahrscheinlich in den Dahlemer Boden ausschließlich anaërobiotische Prozesse abspielen; bei dem Rettgauboden werden aber neben anaërobiotischen auch aërobiotische Prozesse möglich sein.

Kehren wir jetzt wieder zu unserer Tabelle IV zurück, so geben uns die gefundenen Mengen des Salpeterumsatzes in Rettgau- und Dahlemerde unter verschiedenen Feuchtigkeitsverhältnissen eine Bestätigung des vorhin gesagten.

Bei der Rettgauerde hat der Wassergehalt des Bodens auf die Größe der Stickstoffumwandlung keinen wesentlichen Einfluß gehabt. Die Zahlen schwanken und es könnte nur bei einer Feuchtigkeit von 25 und 100 Proz. der Wasserkapazität von einer schwachen Steigerung des Denitrifikationsprozesses die Rede sein. Einen deutlich ausgesprochenen Einfluß kann man aber dagegen bei der Größe der Eiweißbildung beobachten, und es scheint, daß die geringste Feuchtigkeit in dieser Hinsicht am geringsten gewirkt hat.

Bei der Prüfererde liegt die Grenze des Einflusses des Wassergehaltes auf die Art der Salpeterumwandlung zwischen 75—100 Proz. der Wasserkapazität, wie aus der plötzlichen Abnahme der Eiweißbildung sowie der Zunahme der Bildung von elementarem Stickstoff zu erkennen ist. Die anderen erhaltenen Zahlen zeigen zu geringe Unterschiede, als daß man daraus Schlußfolgerungen ziehen könnte. Es scheint aber, daß bei diesem Boden größere Schwankungen in der mittleren Feuchtigkeit die Denitrifikation unwesentlich beeinflussen.

In scharfem Gegensatz zu diesen beiden Böden steht der Dahlemboden. Während bei einer Feuchtigkeit von 25—75 Proz. die Bildung von elementarem Stickstoff zwischen 1—13 Proz. schwankt, steigt sie auf einmal bei 100 Proz. Feuchtigkeit auf 79,1 Proz. Hier tritt also der Einfluß des Wassers auf die Denitrifikation, und zwar auf die Elementarstickstoffbildung ganz deutlich hervor. Und es ist, wie wir oben gezeigt haben, bei einer Feuchtigkeit, welche zwischen 75 und 85 Proz. der Wasserkapazität liegt, wo die für die Denitrifikation günstigen Bedingungen plötzlich einsetzen. Die Eiweißbildung schwankt in der ganzen Versuchsreihe zwischen 16—32 Proz., ohne dabei den Einfluß des Wassers besonders erkennen zu lassen.

Unter den für die Denitrifikation günstigsten Verhältnissen (100 Proz. der vollen Wasserkapazität) hat also der Sandboden (Dahlem) am meisten denitrifizierend gewirkt. Schon bei früheren Untersuchungen haben Lemmermann und seine Mitarbeiter (Landw. Jahrb. 1911. p. 805) gefunden, daß auf Zusatz von organischer Substanz (Blutmehl), Sandboden stärker denitrifiziert als Lehmboden. Wahrscheinlich, weil andere Bakterien den Denitrifikationsprozeß weniger stören.

Ferner erkennen wir aus der Tabelle, daß unter normalen Feuchtigkeitsverhältnissen in der Hauptsache aus dem umgewandelten Salpeterstickstoff Eiweißstickstoff gebildet wird und daß nur geringe N-Verluste in Form von elementarem Stickstoff zu verzeichnen sind.

Wenn aber trotzdem Gerlach und Vogel (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. p. 621) gefunden zu haben glaubten, daß die „Eiweißbildner“ auch dann, wenn im Experiment die natürlichen Verhältnisse tunlichst nachgeahmt wurden, den Denitrifikanten nur sehr geringe Stickstoffmengen zu entreißen befähigt sind, so ist es gerade für die uns interessierende Frage zu bedauern, daß genannte Autoren die Feuchtigkeitsbedingungen in Gewichtsprozenten angeben. In ihren Versuchen wurden Kölbchen mit je 300 g Gartenerde, 5 g Stroh, 1 g $NaNO_3$ und 150 ccm Wasser beschickt und außerdem reichlich mit Eiweißbildnern geimpft. Innerhalb 20 Tagen wurden 50—56 Proz. des Salpeterstickstoffs entbunden. Die Erdkulturen hatten somit mindestens eine Feuchtigkeit von 50 Gewichtsprozenten. Wenn wir dazu unseren Rettgauboden, welcher eine überaus große Wasserabsorptionskraft hat, vergleichen, so wird eine Feuchtigkeit von 50 Gewichtsprozenten fast gleichbedeutend sein mit einer Feuchtigkeit von 100 Proz. der vollen Wasserkapazität, also einem annormalen Wassergehalt entsprechen. Ob nun die Gartenerde eine noch größere Wasserabsorptionskraft hat wie der Rettgauboden, bleibt unentschieden; jedenfalls werden solche Bedingungen unter natürlichen Verhältnissen sehr selten auftreten.

Bei fallendem Wassergehalt nimmt die Salpeterzersetzung und die Bildung von elementarem Stickstoff in den drei Böden ab (vergl. Kurven); sie ist aber bei dem geringsten Wassergehalt nicht am geringsten, sondern scheint wieder etwas zu steigen, wahrscheinlich weil sich im Boden zu gleicher Zeit andere bakteriologische Prozesse abspielen, die den Denitrifikationsprozeß etwas beeinflussen. Ähnliches ist übrigens schon früher von Giustiniani (Ann. Aqron. 27. 1901. p. 262; Ref.: Centralbl. f. Agric.-Chem. 31. 1902. p. 1) festgestellt worden. Er gab nämlich an, daß unter im übrigen gleichen Bedingungen (bei sehr starker Nitratdüngung) dann, wenn der betreffende Boden nur 2—6 Gewichtsprozent Wasser enthielt, eine Denitrifikation deutlich bemerkbar wurde, dagegen bei 10—16 Proz. Feuchtigkeit die Nitrifikation bei weitem überwog.

In Ergänzung zu diesen Versuchen seien zum Schluß noch einige qualitative Prüfungen über das Verhalten der drei Böden in Flüssigkeitskulturen mitgeteilt.

Es wurden zuerst Reagensgläser mit 10 ccm Giltayscher Nährlösung beschickt und diese dann mit gleichen Mengen Dahlem-, Prüfer- und Rettgauerde geimpft. Die Reagensgläser wurden dann im Thermostaten bei einer Temperatur von ca. 30° C belassen und jeden Tag auf die Anwesenheit von Nitrat geprüft.

Das Resultat war folgendes:

Tag nach der Impfung	Dahlem	Rettgau	Prüfer
1	Keine Schaumbildung, starke Nitratreaktion	Wie bei Dahlem	Wie bei Dahlem
2	Schwache Schaumbildung, deutliche Nitratreaktion	Starke Schaumbildung, Nitrat noch vorhanden	Wie bei Rettgau
3	Schaumbildung stärker, Nitrat vorhanden	Nitrat verschwunden	Nitrat verschwunden
4	Nitrat verschwunden	—	—

Wir sehen hieraus, daß der Dahlemboden etwas langsamer denitrifiziert.

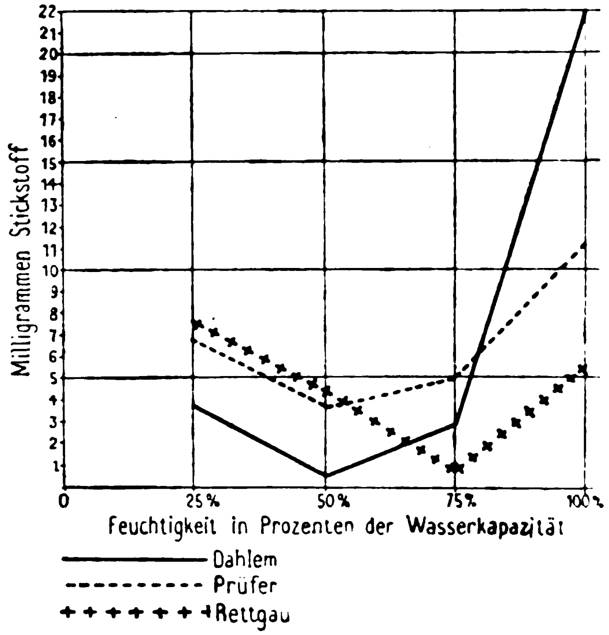
Einige Wiederholungen dieser Versuche mit dem Unterschiede, daß jetzt Erlenmeyerkölbchen mit 100 ccm Giltayscher Lösung und 10 g Erde beschickt wurden, gaben ein ähnliches Bild.

Tag nach der Impfung	Dahlem	Rettgau	Prüfer
2	Kein Schaum, Nitrat	Schwache Schaumbildung, Nitrat	Wie bei Rettgau
3	Schwache Schaumbildung, Nitrat	Starke Schaumbildung, Nitrat	Starke, aber etwas schwächere Schaumbildung wie bei Rettgau, Nitrat
4	Stärkere Schaumbildung, Nitrat	Starke Schaumbildung, Spur Nitrat	Wie bei Rettgau
5	Starke Schaumbildung, Nitrat	Nitrat verschwunden	Nitrat verschwunden
6	Noch starke Gasbildung, Nitrat	—	—
7	Keine Gasbildung, Nitrat verschwunden	—	—
1	—	Kahmhaut, beim schwachen Schütteln entweichen vom Boden Gasblasen	Wie bei Rettgau
2	—	Starke Gasbildung, Nitrat	Starke Schaum- und Gasbildung, Nitrat
3	Schwache Gasbildung	Noch lebhafte Gasbildung, Nitrat verschwunden	Nitrat verschwunden
4	Lebhafte Gasbildung, wenig Schaum, Nitrat	Reaktion zu Ende	Wie bei Rettgau
5	Lebhafte Gasbildung, starke Nitratreaktion	—	—
6 Sonntag	Nicht geprüft!	—	—
7	Reaktion zu Ende	—	—

Es ergibt sich hieraus, daß die drei Böden in Flüssigkeitskulturen ein ganz anderes Verhalten zeigen wie wir vorhin bei den Erdkulturen beobachten konnten.

Prüfer- und Rettgauboden, welche in Erdkulturen bei einer Feuchtigkeit von 100 Proz. der vollen Wasserkapazität noch verhältnismäßig schwach denitrifizieren, zeigen in Flüssigkeitskulturen eine überaus starke Denitrifikationskraft. Zirka 3—4 Tage nach der Impfung war das Nitrat schon vollständig verschwunden. Der Dahlemboden, der bei einer Feuchtigkeit von 100 Proz. der Wasserkapazität kräftig denitrifiziert, entwickelt seine Denitrifikationskraft in Flüssigkeitskulturen äußerst langsam. Hier setzt die Denitrifikation erst ein, wenn sie bei Rettgau und Prüfer schon beinahe zu Ende geführt ist.

Vergleichen wir die erhaltenen Resultate, so scheint der Dahlemboden verhältnismäßig ärmer als die übrigen an Denitrifikatoren zu sein. Dies findet seine Begründung darin, daß der Boden in Flüssigkeitskulturen sehr langsam denitrifiziert; die Bakterien, die mit der 10 g Erde in die Flüssigkeit hineingeimpft werden, müssen sich erst vermehren, um ihre Denitrifikationskraft deutlich entfalten zu können. Daß sie aber kräftig denitrifizieren können, beweisen uns sowohl die Versuche in Erd- als in Flüssigkeitskulturen, nur bedarf es längerer Zeit als bei Prüfer- und Rettgauerde.



Bildung von elementarem Stickstoff in den 3 Böden bei verschiedenem Wassergehalt.

Diese beiden letzten Erden dagegen müssen im Vergleich zu der Dahlemerde reich an Denitrifikatoren sein oder kräftigere Denitrifikatoren enthalten, weil sie eben in Flüssigkeitskulturen außerordentlich rasch denitrifizieren. Unter natürlichen Verhältnissen, d. h. im nicht mit Wasser übersättigten Boden, kommen sie nicht so einseitig zur Entwicklung. Sobald aber die Bedingungen so gewählt werden, daß die Mikroben nur auf dem im Boden vorhandenen Nitratsauerstoff angewiesen sind, so zerstören sie außerordentlich rasch den gebotenen Salpeter.

Ferner zeigen die Versuche wieder, wie sehr verschieden sich Denitrifikationsprozesse in Flüssigkeitskulturen und Erdkulturen abspielen, und es wird oft zweckmäßig sein, bei bakteriologischen Bodenuntersuchungen beide Methoden heranzuziehen.

Zusammenfassung.

Fassen wir die Ergebnisse nochmals kurz zusammen, so haben die Versuche gezeigt, daß sich die verschiedenen Böden auch bei relativ gleich hohem Wassergehalt bezogen auf die volle Wasserkapazität hinsichtlich der Umwandlung des Salpeters durchaus verschieden verhalten.

Bei einem der vollen Wasserkapazität entsprechenden Wassergehalt ist in allen Fällen die größte Salpetermenge zerstört.

Die Bildung von elementarem Stickstoff nimmt mit fallendem Wassergehalt ab, ist aber nicht immer bei dem geringsten Wassergehalt am geringsten. Das hängt vielleicht damit zusammen, daß der Denitrifikationsprozeß durch andere bakteriologische Prozesse beeinflußt wird.

Nachdruck verboten.

The Number and Growth of Protozoa in Soil.[1]

[From the Laboratory of the Department of Agricultural Bacteriology,
University of Wisconsin, Madison, Wis., U. S. A.]

By **J. M. Sherman.**

Introduction.

For more than half a century it has been known that the soil contains a complex protozoan fauna which includes ciliates, flagellates and amoebae. A great deal has been published on the subject of the soil protozoa, and within recent years these organisms have attracted considerable attention as possible factors in soil fertility. Since it has not been proven that any of the protozoa are active in normal soils, it is not known whether or not they have any important relation to the soil processes. In view of the present unsatisfactory and incomplete state of our knowledge of the subject, a preliminary report on two phases of the work undertaken seems justifiable. The repeated review, in papers of recent date, of the literature on the soil protozoa, makes a historical resumé of the subject unnecessary.

I. The Number of Protozoa in Various Soils.

Present Status.

Not withstanding the attention the soil protozoa have attracted, very little data is at hand showing the number of such organisms found in normal soils. Hiltner[2]) and Störmer[3]) have reported the finding of a great number of protozoa in garden soils; the latter observed the development of several colonies of amoebae on agar plates, in which the inoculum consisted of only one mg. of soil. Stone, Lodge and Smith[1]), on the other hand, investigated field soils of Massachusetts and claimed the number of protozoa present would have to be increased many fold in order to be considered a factor in the limitation of bacterial numbers. Gainey[2]) studied the protozoa in Missouri soils and likewise concluded that the number was not sufficient to be a factor in soil fertility.

---

[1]) Published with the permission of the Director of the Agricultural experiment Station.

[2]) Hiltner, L., Jahresber. d. Vereinig. f. angew. Bot. Bd. 5. 1907. p. 113.

[3]) Störmer, K., Ibid. p. 200.

In soils which receive large amounts of organic matter in the form of stable manure, as in the case of garden soils, examples of which were studied by Hiltner and Störmer, it is readily seen how amoebae might accumulate in large numbers. In reviewing the works of Stone, Lodge and Smith, and of Gainey, it is worthy of note that the types of organisms recognized by them consisted of ciliates and amoebae and some of the larger flagellates. It is possible that some of the minute flagellates, with which this paper has mainly to deal, escaped observation.

Methods.

The dilution method, which has been employed to some extent for estimating the number of protozoa in soil, has been used in this work. It is obviously impossible to devise one medium for use which will favor equally the development of all of the various forms of unicellular animal organisms found in the soil. In the preliminary work undertaken, various media were used with the idea of finding which forms of protozoa are most abundant in soil, and which media are best adapted to those particular forms.

From observations on several media it was early observed that the flagellates make up the greater portion of the protozoan population of the soil. The survey of media has not been very extensive, but a dilute soil extract has given the most satisfactory results for determining the number of flagellates. This medium is also well suited for the growth of ciliates and amoebae. The use of soil extract seems appropriate as it would appear that the organisms favored by this medium would be the ones most likely to be leading a trophic life in the soil. One per cent hay extract, which has been used by most investigators in the study of the soil protozoa, has not given as satisfactory results as has soil extract, in the comparison made at this laboratory.

Soil extract prepared by boiling one part of soil in three parts of distilled water, filtering clear, and adding a small excess of $CaCO_3$, to prevent an acid reaction, has been used. This has been modified by using only one part of soil in nine parts of water and one part of a 1 per cent hay extract, plus $CaCO_3$. The presence of this small amount of hay extract does not appear to exert any inhibitory effect upon the flagellates, while the ciliates seem to be benefited. In sampling soil not less than ten grams have been taken, and duplicate dilutions have always been made. The cultures have been incubated at 20—25° C. and examined every few days for a period of about ten days.

Results.

The data obtained on twelve Wisconsin soils, representing various types under different treatments, are tabulated in table I.

---

[1]) Stone, G. E., Lodge, C. A. and Smith, R. G., Ann. Rep. Mass. Agr. Expt. Sta. 24. p. 121—134.

[2]) Gainey, P. L., Ann. Rpt. Mo. Bot. Garden. 23. 1912. p. 147.

Table I.

The Approximate Number of Protozoa in Various Wisconsin Soils.

No.	Type of Soil	Treatment of Soil	Dilutions			
			$^1/_{1000}$ gm.		$^1/_{10\,000}$ gm.	
			A	B	A	B
1	Clay loam	Apple orchard	+	+	+	+
2	,, ,, ...	Blackberry patch	+	+	—	+
3	Rich ,, ...	Garden	+	+	+	+
4	Sandy ,, ...	Tobacco field	+	+	+	—
5	Peat soil	Uncultivated	† +	+	+	—
6	Loam soil	Pasture	+	+	—	—
7	Clay loam	Vineyard	* +	* +	—	+
8	Loam soil	Alfalfa field	+	+	—	+
9	Clay loam (green-house) . .	Not planted	* +	* +	+	—
10	Sandy ,, ,, ,, . .	Clover bed	+	+	—	—
11	,, ,, ,, ,, . .	Castor bean bed	+	+	—	+
12	Sandy loam	Corn field	+	+	+	+

"A" and "B" represent the duplicate samples of each soil.
Plus sign (+) = presence of protozoa.
Minus sign (—) = no protozoa present.
* Colpoda found in addition to flagellates.
† Amoeba ,, ,, ,, ,, ,,

That the high protozoan content above noted is not peculiar to Wisconsin soils is shown by the data obtained from three Virginia soils and one Tennessee soil given in table II. Theses samples were from representative soils in a good state of cultivation.

Table II.

The Approximate Number of Protozoa in Virginia and Tennessee Soils.

No.	Source	Type of Soil	Treatment of Soil	Dilutions			
				$^1/_{1000}$ gm.		$^1/_{10\,000}$ gm.	
				A	B	A	B
1	Virginia	Clay	Garden	+	+	+	+
2	,,	Clay loam	Wheat field	+	+	—	+
3	,,	Loam	Grass	+	" +	+	+
4	Tennessee	Compact red clay	Corn ,,	+	+	—	—

"A" and "B" represent the duplicate samples of each soil.
Plus sign (+) = presence of protozoa.
Minus sign (—) = no protozoa present.
" Balantiophorus elongatus found in addition to flagellates.

The above tables show that, in the sixteen soils recorded, in every soil protozoa were found in both samples of the $^1/_{1000}$ of a gram dilution, while of the total of 32 dilutions representing $^1/_{10\,000}$ of a gram, 18 revealed the presence of protozoa. When we consider that, 1. it is extremely improbable that every individual protozoan grows when taken from the soil and introduced into a liquid medium; 2. the liqiuid medium used is probably not adapted for the growth of all protozoan inhabitants of the soil; and 3. some of the samples representing only $^1/_{10\,000}$ of a gram contained three distinct types of animal organisms, the statement that the average fertile soil contains about 10,000 protozoa per gram seems conservative.

In cultures inoculated with $^1/_{1000}$ of a gram of soil, a variety of flagellates are usually to be observed. As seen from the above data, the ciliates do not ordinarily occur in numbers approximating 1,000 per gram. Colpoda cucullus and Colpoda steinii, which have been widely noted as inhabitants of soil, appear to be the most generally distributed ciliates. One of these organisms may be very often, but not constantly, found in $^1/_{100}$ of a gram of soil. In one Virginia soil (table II), Balantiophorus elongatus was found in the $^1/_{1000}$ of a gram dilution. With the methods employed, it would not be safe to draw conclusions regarding the amoebae other than they do not occur in numbers nearly as great as do the flagellates in ordinary soils. Although the culture media and period of observation used are not adequate for work with the amoebae, it is worthy of note that in the peat soil, containing a high humus and water content (in which we would expect to find numerous amoebae), the method was of sufficient service to show their presence in $^1/_{1000}$ of a gram in one of the two samples taken. In spite of the limitations of the methods used, ameobae would surely have been revealed had they been of general occurrence in large numbers. Using the same medium and inoculating with a large amount of soil, amoebae have been observed as early as the third day.

On the dilutions of $^1/_{10\,000}$ of a gram, with one exception, only four general types of protozoa have as yet been noted: Monas (sp.), Dimorpha radiata, and two flagellates which are not recognized.

II. The Growth of Protozoa in Soil.

Previous Work.

In order to correlate the protozoa with any of the vital functions of the soil, it is first necessary to demonstrate that they are active in soils of normal moisture content. To Goodey[1]) we are indebted for the most important contribution yet published on this point. He observed that where free water was to be found on the soil the presence of active protozoa could be demonstrated. In soils of normal moisture content, after a very careful study of the ciliates (with which his work dealt), it was concluded that these organisms exist in the soil only in the encysted condition. Russell and Golding[2]) by working with waterlogged, "sewagesick" soil demonstrated the presence of active protozoa. Under these conditions, as was pointed out by Goodey, many protozoa may become active. When we consider the relative size of these micro-organisms and the space between soil particles, it is obvious that they may become active whenever the soil is in a saturated condition.

Experimental.

In order to see if any of the soil protozoa are active, the following experiment was performed. Four pots each containing two kilograms of sterilized soil, were inoculated with two grams each of a normal soil, which showed 10,000 protozoa per gram by the dilution method. These pots were then brought up to varying moisture contents by the addition of sterile water, as follows:

---

[1]) Goodey, T., Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Vol. 84. No. 570. p. 165.

[2]) Russell, E. J. and Golding, J., Journ. Agr. Sci. Vol. 5. Part 1. 1912. p. 27.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Pot No. 1 = 11 % H_2O
„ No. 2 = 12 % „
„ No. 3 = 15 % „
„ No. 4 = 22 % „

Since one gram of normal soil, with a protozoan count of 10,000 per gram, was used to inoculate 1,000 grams of sterile soil, the resulting mixture should contain, approximately, only 10 of these organisms per gram. After fifteen days incubation at 20—25° C., these pots were sampled, and in every case flagellates were found in the $^1/_{10\,000}$ dilutions. This could not be explained in any way other than that these animal organisms had undergone rapid multiplication. The forms found in greatest numbers in these pots were the same forms which were noted as the predominating types in normal soils. In the case of pot 4, with a moisture content of 22 per cent, Colpoda cucullus was found in the $^1/_{100}$ dilution, showing that this organism was probably active in the soil containing this high amount of water.

To obtain more definite data on this point, with known organisms, an experiment was performed in which pots of sterilized soil were inoculated with animal pure cultures of the three types of flagellates described in the first part of this paper. The pots were inoculated with 0.1 gm. each of soil cultures of the respective organisms per 1,000 grams of sterile soil. The water content was then held at 15 per cent (a little below normal for a soil of this type). Determinations for protozoa were made immediately after inoculation, and then at intervals for fifteen days. The results obtained are given in table III.

Table III.
The Multiplication of Three Types of Protozoa in Soil (H_2O Content 15 %).

Organism	Number of Protozoa per Gram of Soil				
	Start	6 days	9 days	12 days	15 days
Monas	1	10	10	1,000	10,000
Dimorpha . .	1	100	100	1,000	100,000
Flagellate "A"	10	100	1000	10,000	100,000

In a similar test using Colpoda cucullus, no multiplication could be detected in a period extending over thirty days. This would appear to substantiate further the results of Goodey on the ciliates.

A point which probably deserves mention in this connection, is that when sterilized soil is inoculated with normal soil, the protozoan fauna rises in numbers above that of normal soil, just as does the bacterial flora. In other words, it is probable that the microorganic balance remains about the same. In table IV are given the results obtained on five pots of sterile soil which were inoculated with normal soil.

Higher dilutions have not been tried, but it is not unlikely that under such conditions the number of protozoa may reach 1,000,000 per gram. This fact is not of great significance, but it has a practical application in that subsequent workers, who desire to study the interaction of protozoa and bacteria, may properly do so in a sterilized soil medium; a point which has been questioned by Russell and Hutchinson[1]).

---

[1]) Russell, E. J. and Hutchinson, H. B., Journ. Agr. Sci. Vol. 5. Part 2. 1913. Foot note p. 185.

Table IV.
The Approximate Number of Protozoa in Reinoculated Sterile Soil.

Pot No.	Dilutions			
	$^1/_{10\,000}$ gm.		$^1/_{100\,000}$ gm.	
	A	B	A	B
1	+	+	+	+
2	+	+	+	—
3	+	+	+	+
4	+	+	—	+
5	+	+	+	+

"A" and "B" represent the duplicate samples of each pot.
Plus sign (+) = presence of protozoa.
Minus sign (—) = no protozoa present.

Summary.

1. The data obtained, on sixteen soils representing various types under various treatments as to cultivation, show that the normal fertile soil has a protozoan content approximating 10,000 per gram, as revealed by the crude methods employed.
2. The flagellates constitute the greater portion of the protozoan fauna of the soil, and not the ciliates nor amoebae.
3. Colpoda cucullus appears to be the most widely distributed ciliate in soil, and may occasionally be found in numbers approximating 1,000 per gram.
4. The methods used do not permit of any conclusions being drawn regarding the number of amoebae, except that they do not ordinarily occur in numbers nearly as great as do the flagellates.
5. Certain forms of the soil protozoa are active under normal, and even sub-normal, conditions of moisture.
6. The active protozoan inhabitants of most soils are probably restricted to the flagellates.
7. Colpoda cucullus is probably active whenever the moisture content is much above normal, but does not appear to be so ordinarily.

Referate.

Theißen, F., Über Membranstrukturen bei den Mikrothyriaceen als Grundlage für den Ausbau der Hemisphaeriales. (Mykol. Centralbl. III. 1913. p. 273—286).

Die Gruppe der Askomyceten, die ein halbiert schildförmiges Gehäuse besitzen, wurde früher zu der Familie der Mikrothyriaceen zusammengefaßt, bis v. Höhnel nachwies, daß hier entwicklungsgeschichtlich ganz verschiedene Dinge zusammengeworfen werden. Man muß nämlich zwischen solchen Gattungen unterscheiden, bei denen an einer Traghyphe zwischen der Ansatzstelle und der Blattoberfläche sich zuerst das schildförmige Gehäuse und dann der Nukleus entwickelt (vielleicht könnte man diesen Typus als „Lampenschirmtypus" bezeichnen) und zwischen solchen, wo von den Hyphen an der Blattoberfläche schirmartig das schildförmige Gehäuse sich bildet („Regenschirmtypus"). Die letztere Gruppe wird vom Verf. als Hemisphaeriales den übrigen Ordnungen der gehäusetragenden Askomyceten gegenübergestellt. Damit ist auf Grund der Entwicklungsgeschichte eine Teilung der Ordnung gegeben.

Die Mikrothyriaceen repräsentieren den invers-radiären Typus (Lampenschirm). Den anderen Typus vertreten die Dictyopeltineen, bei denen das Schild aus einem maschigen Hyphennetz wächst, und die Thrausmatopeltineen, wo eine schollige Struktur des Schildes auftritt. Bei den Mikrothyriaceen findet man den rein radiären Bau des Schildes, indem die Hyphen radiär weiter wachsen und die radialen Lücken durch dichotome Verzweigung schließen. Bei der Netzstruktur entsteht zuerst ein maschiges Netz mit fast rechten Winkeln, was besonders am Rande des Schildes deutlich hervortritt. Die Netzmaschen werden dann erst durch Zweige, die an den Netzhyphen auftreten, ausgefüllt. Bei der Schollenstruktur endlich zerfällt die parenchymatisch erscheinende Membran des Schildes in würflige Schollen, die in der Aufsicht deutlich hervortreten. Auf nähere Einzelheiten kann hier nicht eingegangen werden.

Mit dieser entwicklungsgeschichtlichen Grundlage läßt sich eine Gattungsübersicht geben, wie sie den heutigen Anschauungen entspricht, und zugleich mit Sicherheit alles ausscheiden, was bis jetzt fälschlich in diese Gruppe hineingebracht worden ist.

Das halbierte Gehäuse der Mikrothyriaceen wird Thyriothecium genannt. Wir bekommen dann folgende Übersicht:

Microthyriaceae.

Thyriothecien invers-radiär, oberflächlich.

- A. Freies Luftmycel fehlt.
  - a) Sporen einzellig. Farblos: Myocopron. Braun: Vizella.
  - b) Sporen zweizellig.
    - I. Sporen farblos. Microthyrium.
    - II. Sporen braun.
      - 1. Thyriothecien kreisförmig. Seynesia.
      - 2. Thyriothecien linear. Mit Paraphysen: Lembosina, ohne: Morenoina.
  - c) Sporen dreizellig, braun. Scutellum.
  - d) Sporen vierzellig, braun. Halbania.
  - e) Sporen mehrzellig, farblos. Phragmothyrium.
  - f) Sporen fädig. Ophiopeltis.
- B. Luftmycel vorhanden.
  - a) Sporen einzellig, braun. Lembosiella.
  - b) Sporen zweizellig.

- I. Sporen farblos. Mycel mit Hyphopodien: Asterella, ohne: Calothyrium.
- II. Sporen braun.
  - 1. Thyriothecien rundlich.
    - α) Mit Hyphopodien.
      - * Membran einschichtig. Mycelkonidien vierzellig. Clypeolella.
      - ** Membran mehrschichtig. Mycelkonidien einzellig.
        - Membran nach außen und innen Schleim absondernd. Englerulaster.
        - Membran außen nicht Schleim absondernd: Asterina.
    - β) Ohne Hyphopodien. Asterinella.
  - 2. Thyrothecien linear.
    - α) Sporen farblos. Lembosiopsis.
    - β) Sporen braun. Mit Paraphysen: Lembosia, ohne: Morenoella.

Hemisphaeriaceae.

Gehäuse halbiert-schildförmig, nicht invers-radiär, freistehend.

Dictyopeltineae mit Netzstruktur.

- A. Sporen einzellig, farblos. Dictyothyrina.
- B. Sporen zweizellig, farblos. Ostiolum kreisförmig: Dictyothyrium, ohne Ostiolum: Dictyopeltis.
- C. Sporen vier bis- mehrzellig. Mit Paraphysen: Micropeltis, ohne: Micropeltella.
- D. Sporen fädig. Sporen quergeteilt: Scolecopeltis, ungeteilt: Ophiopeltis.

Thrausmatopeltineae mit Schollenstruktur.

- A. Sporen zweizellig, farblos.
  - a) Fruchtkörper rundlich, ohne freies Mycel. Mit Paraphysen: Clypeolum, ohne: Microthyriella.
  - b) Fruchtkörper länglich, mit kurzem, peripherischem Mycel: Epipeltis.
- B. Sporen vier- bis mehrzellig. Phragmothyriella.

G. Lindau (Berlin).

Löhnis, F., Zur Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau. (Fühlings landw. Ztg. 1913. p. 838.)

Verf. nimmt auf die vor kurzem unter dem gleichen Titel erschienene Mitteilung Ehrenbergs (siehe diese Zeitschrift Bd. 41. p. 279) Bezug, welche sich mit dem J. Kühnschen langjährigen Roggenanbauversuch beschäftigt und wahrscheinlich zu machen sucht, daß für die Stickstoffentnahmen durch die Roggenernten außer dem Bodenstickstoff in sehr erheblichem Maße der durch Niederschläge in den Boden gelangende Stickstoff in Betracht komme, dessen Menge in der Industriestadt Halle viel höher (auf reichlich 15 kg pro Hektar) anzusetzen sei als an anderen Orten. Der Kühnschen Annahme einer bemerkenswerten Stickstoffassimilation brauche man daher nicht beizutreten. Hierbei wird Halle in Parallele gesetzt mit Leeds, für welche Stadt von Crowther und Ruston entsprechende Untersuchungen ausgeführt worden sind.

Löhnis ergänzt nun an Hand der Angaben dieser englischen Autoren die Ehrenbergschen Ausführungen, wobei allerdings ein Bild entsteht, das dem von Ehrenberg entworfenen nicht mehr gleicht. Der Stickstoffgehalt in den in Leeds analysierten Regenwässern steigt und fällt nämlich mit ihrem Reichtum an freier Säure, an Teer und an Ruß. Die Pflanzen gedeihen daher dort um so schlechter, je reicher die Niederschläge an Stickstoff sind, weil sie gerade dann durch Teer, Ruß und Säure schweren Schaden leiden. Die Blätter zeigen fest haftende Überzüge, welche das Sonnenlicht fernhalten und die Tätigkeit des Blattgrüns erschweren. Die Verhältnisse in Halle sind, wie hieraus folgt, von denen der englischen Kohlenstadt von Grund auf verschieden.

Auch der Annahme Ehrenbergs, daß die durch Versickerung entstehenden Stickstoffverluste gleich oder eher noch niedriger seien als die durch Ammoniakabsorption dem Boden zufließenden Stickstoffgewinne, schließt sich Verf. nicht an. Er glaubt vielmehr, daß häufig die Sickerverluste größer sein werden wie die — nach Versuchen von Hall und Miller — recht geringe, durch Ammoniakabsorption zustande kommende Stickstoffaufnahme. „Es liegt durchaus kein Anhalt dafür vor, daß nicht auch in diesem (dem Kühnschen), wie in einer ganzen Reihe ähnlicher Fälle eine Stickstoffbindung im Boden stattgefunden hat. Sie mußte sich naturgemäß innerhalb relativ enger Grenzen halten, da der den Umfang der Tätigkeit der stickstoffbindenden Mikroben bestimmende Humusersatz dauernd gering war. Allein in Form von Ernterückständen wurde dem Felde einige organische Substanz zugeführt, und etwa 100 Teile organischer Substanz sind nötig zur Bindung von nur 1 Teil Stickstoff.“ Vogel (Bromberg).

Wehmer, C., Holzansteckungsversuche mit Hausschwamm (Merulius lacrymans). (Jahresber. d. Vereinig. f. angew. Bot. 1913. T. 1. p. 106—116.)

Infektion mit Sporen ist wiederum nicht gelungen. Eine Infektion mit abgetrennten Mycelstücken mißlang selbst bei intensiver Luftfeuchtigkeit auf lufttrockenem Holz; auf feuchtem Holz wurde die Entwicklung durch Bakterien usw. gehemmt. Nur auf gut durchfeuchtetem keimfreien Holz entwickelte sich abgetrenntes Mycel gut.

Genügende Substratfeuchtigkeit ist für die Entwicklung des Pilzes überhaupt entscheidend. Es ist daher verständlich, daß Ansteckung durch Mycelrasen, die im Zusammenhang mit ihrem Substrat (und so ihren Substrathyphen) stehen, selbst bei weniger hoher Luftfeuchtigkeit sehr leicht erfolgt; in diesem Falle lebt der Pilz unter den günstigsten Bedingungen (Nährstoff- und Wasserversorgung, Widerstandsfähigkeit gegen Konkurrenten) im Gegensatz zu durch Abtrennung vom Ursprungsmycel geschwächten Mycelstücken.
Rippel (Augustenberg).

Reuter, O. M., Lebensgewohnheiten und Instinkte der Insekten bis zum Erwachen der sozialen Instinkte. Vom Verf. revidierte Übersetzung nach dem schwedischen Manuskript besorgt von **A.** und **M. Buch.** XVI + 448 pp. mit 84 Fig. im Text. Berlin (R. Friedländer & Sohn) 1913. ℳ 16,—.

Wer einem angehenden Entomologen zur Einführung in die Biologie der Insekten im engeren Sinne, in die Lehre von ihren Lebensgewohnheiten, ein zuverlässiges und einigermaßen eingehend orientierendes Werk empfehlen wollte, dem blieb eigentlich kaum eine Wahl: war auch der erste Band von Vitus Grabers klassischer Darstellung längst überholt, der zweite Teil, obgleich ebenfalls 1877 erschienen, war immer noch das beste, was wir besaßen und konnte, schon der Abgrenzung des Stoffes wegen, nicht durch Taschenbergs praktische Insektenkunde ersetzt werden.

Für die Entomologie, naturgemäß aber ganz besonders für denjenigen ihrer Zweige, der ganz besonders eingehendes Studium der Lebensgewohnheiten und Instinkte der untersuchten Insekten verlangt: für die angewandte Entomologie darf ein ganz außerordentlicher Gewinn aus der vorliegenden

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

überaus sorgfältigen Arbeit des Verf., des bedeutendsten lebenden Vertreters der eigentlichen Insektenbiologie, erhofft werden.

Dem Zoologen oder Botaniker, der sich dem Studium der angewandten Biologie zuwenden will, kann der Ref. nur dringend empfehlen, zuerst gründlich dieses Buch und nichts anderes zu lesen. Er kommt ja zumeist aus einem Arbeitsbereich, in dem ihm — die Lage der Universitätsinstitute und auch ihre allgemeine Lehraufgabe bedingen das — das exakte Beobachten des Insektes in der freien Natur eine sehr fernliegende Sache ist. Ref. bekennt gern, das es ihm vor 10 Jahren nicht anders ging und das ihm damals immer als wichtigste und erste Aufgabe die erschienen sein würde, irgendein Larvenstudium, etwa, im geeigneten Momente, das heißt nach eben vollzogener Häutung, gut zu fixieren, einzubetten und zu schneiden, kaum aber sich draußen stundenlang auf die Lauer zu legen und es, höchstens mit der Lupe bewaffnet, in seinen Lebensgewohnheiten zu beobachten.

Die Morphologie ist gewiß das A und O aller physiologischen und biologischen Forschung. Aber die Disposition zu einseitiger Überschätzung des Morphologischen wird ebenso gewiß stets mit Vorteil, ja bei dem, der angewandte Entomologie treiben will, notwendig korrigiert werden müssen. Und dieses korrigierende Eindringen in den Tatsachenschatz und die Methodik der Insektenbiologie kann durch kein anderes Werk in solchem Maße erleichtert werden, als das des großen Helsingforser Zoologen.

Auf den Inhalt im einzelnen einzugehen würde hier viel zu weit führen, selbst eine Aufzählung der 26 Kapitelüberschriften, die sich aus der natürlichen Einteilung des wohlumgrenzten Stoffes von selbst ergeben, dürfte den Leser nur ermüden. Daß das ihn, ich meine also den Pflanzenpathologen, Interessierende nicht nur in den Kapiteln über den Nahrungsinstinkt, Wanderinstinkt, über den Schutz gegen ungünstige Naturverhältnisse, Krankheiten und Feinde zu finden ist, das versteht sich ja von selbst. Aber nicht unerwähnt darf das allein den Raum von fast vier Druckbogen einnehmende Literaturverzeichnis bleiben, das, wenigstens für die beiden letzten Dezennien, kaum eine einzige Arbeit biologisch (im engeren Sinne) wichtigeren Inhaltes vermissen läßt, sich jedenfalls in solchem Maße der Vollständigkeit nähert, als auf dem zur Verfügung stehenden Raum nur irgend erreichbar war, und das dem, der durch das Reutersche Buch sich hat auf das überaus dankbare Feld der Insektenbiologie führen lassen, noch lange ein sehr bequem zu befragender Ratgeber sein wird.

M. Wolff (Bromberg-Schröttersdorf).

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien etc.

Steffenhagen, K., Über die Behandlung des Trinkwassers mit Chlorkalk. (Hyg. Rundsch. 1914. p. 185—208.)

Beginnend mit den klassischen Desinfektionsversuchen von R. Koch wird erwähnt, daß die Eigenschaft des Chlorkalks, sowohl die harmlosen Saprophyten im Trinkwasser als auch die pathogenen Keime in demselben zu vernichten oder mindestens abzuschwächen, schon seit der damaligen Zeit bekannt ist. Es muß aber von einem praktisch verwendbaren chemischen Trinkwassersterilisationsmittel verlangt werden, daß es nicht allein die verschiedenen Keime schädigend oder abtötend beeinflußt, sondern daß es auch auf Geruch, Geschmack und Aussehen nicht unangenehm und störend einwirkt und infolge chemischen Einflusses keine gesundheitsschädlichen Umsetzungen hervorruft. Dabei muß ein solches Verfahren in der Anwendung billig und einfach sein. Diese Forderungen mit Chlorkalk zu erfüllen, ist sehr schwer, da schon einige Milligramm Chlor in einem Liter Wasser Geschmack und Geruch sehr unangenehm beeinflussen und nur durch Zusatz weiterer chemischer Mittel, z. B. Natriumsulfit und Natriumkarbonat, unter dem Namen Antichlor, die üblen Eigenschaften behoben werden können. — Verf. geht dann in eingehendster Weise auf die bisherigen deutschen und ausländischen Arbeiten ein. Die im Anfange genannten Autoren hatten zur Kontrolle der Chlorwirkung nur geringe Mengen (meist 1 ccm) der der Desinfektion ausgesetzten Wasserproben nach Abschluß auf Keimminderung oder Abtötung geprüft, und viele hatten zum Nachweis der lebensfähig gebliebenen Keime ausschließlich feste Nährböden benutzt; man fand aber später, daß bei Anwendung flüssiger und fester Nährböden bei ersteren Wachstum eintrat, während die festen steril blieben. Nach dieser Erfahrung ging man auf die Verwendung von einem und mehreren Litern Wasser über, um Einblick in die Desinfektionswirkung zu gewinnen, und Engels kam zu dem Resultat, daß 106 mg freies Chlor auf 1 l sicher imstande sind, innerhalb zehn Minuten Choleravibrionen, Typhusbazillen und Eiterkokken abzutöten. Dann wurden Versuche mit Chloreinwirkung bei zentralen Trinkwasseranlagen in Verbindung mit dem Ferrochlorverfahren gemacht. Da die Versuche nicht günstig ausgefallen waren, sah man von Benutzung dieses Chlorkalkverfahrens ab. Auch über sonstige günstige Versuche wurde damals in Deutschland nichts bekannt, während man aus England 1905 bei einer Typhusepidemie über gute Erfolge berichtete, die Typhusbazillen ganz abtötet und Bact. coli von 100 Proz. vor der Desinfektion auf 22,7 Proz. herabgegangen waren. Von Amerika liegen auch günstige Berichte aus einer großen Anzahl von Städten vor; hier erstreckt sich das Chlorkalkdesinfektionsverfahren auf die Anlagen, in welchen das Wasser einer langsamen Sandfiltration oder einer Schnellfiltration unterzogen wird, in manchen Städten aber auch auf Rohwasser. Die p. 193—195 bringen eine große Anzahl günstiger amerikanischer Resultate; es ergibt sich aber bei genauerer Einsicht, daß dort der Erfolg anders als bei uns in Deutschland bewertet wird und daß man keine Keimfreiheit, sondern nur tunlichst weitgehende Befreiung von Krankheitserregern bezweckt. In manchen Berichten fehlen überhaupt Angaben, ob eine Prüfung über die Wirksamkeit stattgefunden hat. — Die Höhe des Chlorkalkzusatzes wird bemessen nach der chemischen Zusammensetzung des zu desinfizierenden Wassers und andererseits durch die übrige noch folgende Behandlung. Bei diesen Untersuchungen fand man auch, daß ein

Chlorüberschuß beim Durchgang des Wassers durch die Leitungsröhren oder während des Aufenthaltes im Reservoir verschwand, aber auch dann vermeidet man zur Verhinderung der Geschmacksbeeinflussung Steigerung der Chlorzusätze. Eine schädliche Einwirkung durch freies Chlor glaubt man der anderweitigen Bindung wegen nicht befürchten zu müssen. Die verschiedenartigsten, mehr oder minder berechtigten Klagen über die physikalische Beschaffenheit des diesem Verfahren unterzogenen Wassers wurden geäußert und ist jedenfalls eine dem Chlorkalkzusatz vorhergehende Prüfung des Wassers zur tunlichsten Vermeidung der Übelstände erforderlich. — Es folgen noch eine große Reihe von Versuchen mit verschiedenen Resultaten, und manche Forscher ziehen der Anwendung des Chlorkalkverfahrens weite Grenzen. Nach zahlreichen Literaturangaben (92) spricht Verf. den Wunsch nach weiteren Studien aus, um möglichst vielgestaltige Erfahrungen zu sammeln und die Unterlagen für die Beurteilung eines wegen seiner Billigkeit und Einfachheit bereits teilweise bewährten Wasserreinigungsverfahrens zu vermehren. Rullmann (München).

Spieckermann, Bemerkungen zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses. (Ill. landw. Ztg. Jg. 34. 1914. p. 7 u. 16.)

Der zuerst im Jahre 1909 in Deutschland (Westfalen und Rheinland) aufgetretene und durch den Pilz Chrysophlyctis endobiotica Schilb. verursachte Kartoffelkrebs ist auch im Jahre 1913 erheblich aufgetreten, wobei er sich allerdings nur auf die Felder der Industriearbeiter und der Stadtgärten beschränkt und die landwirtschaftlichen Betriebe bisher verschont hat. Immerhin ist aber die Möglichkeit einer Verschleppung in Gegenden des landwirtschaftlichen Betriebes nicht von der Hand zu weisen, wenn auch nicht zu fürchten ist, daß die Krankheit bei der üblichen rationellen Fruchtfolge in größeren landwirtschaftlichen Betrieben gefährlich werden dürfte. Die Verbreitung der Krankheit kann sowohl durch den Boden, wie auch durch infiziertes Pflanzgut erfolgen. Was die Bekämpfung der Krankheit anbetrifft, so wird sie sich nach der ganzen Sachlage auf die Gesundung der verseuchten Felder erstrecken müssen. Am einfachsten gestaltet sich die Bekämpfung durch eine längere Einstellung des Kartoffelbaues, die aber, da es sich zumeist um kleine Felder handelt, in sozialer Beziehung manche Bedenken auslöst, so daß die Auffindung anderer Wege angestrebt werden muß. Ein Einfluß der Düngung auf die Entstehung der Krankheit ist nicht vorhanden und betreffs der Bodenbearbeitung liegen noch keine exakten Erfahrungen vor. Zweifellos besteht aber in der Anfälligkeit der Kartoffelsorten ein wesentlicher Unterschied, wie auch die Pflanzzeit und das Vorkeimen voraussichtlich nicht ohne Einfluß auf den Befall sein werden. Recht aussichtsvoll erscheint eine Desinfektion des verseuchten Bodens und zwar nicht mit löslichen Mitteln, die einerseits relativ schnell aus dem Boden ausgewaschen werden und andererseits in stärkeren Konzentrationen das Pflanzenwachstum hemmen, sondern in der Anwendung des gemahlenen Schwefels, dem „Ventilato-Schwefel“. Durch seine Anwendung ist es gelungen, aus Knollen mit Krebsgeschwülsten krebsfreie Pflanzen zu ziehen. Dies geschah in der Weise, daß in die Pflanzlöcher so viel Schwefel gebracht wurde, daß der Boden damit dünn bedeckt war und daß ferner auf die Pflanzkartoffel eine kleine Menge Schwefel gestreut wurde. Auf verseuchtem Boden hat die Schwefelung der Pflanzlöcher natürlich weniger Aussicht auf Erfolg, es muß vielmehr der Boden derart mit Schwefel durchdrungen sein, daß die

Schwärmer des Pilzes überall auf das Desinfektionsmittel (das ist die aus dem Schwefel entstehende Schwefelsäure) stoßen. Bei den im Jahre 1912 durchgeführten Versuchen wurde der Schwefel 14 Tage vor dem Pflanzen ausgestreut (2 und 5 kg auf 1 a) und bis zu 25 cm Tiefe mit dem Boden innig vermischt. Zum Vergleich kamen auch flüssige Desinfektionsmittel (Formaldehyd, Kreosolschwefelsäure, Saprosol, Karbolineum und Schwefelkohlenstoff), durch die nur in recht hohen Konzentrationen ein gewisser Erfolg zu erzielen war, der nicht in der Gesamternte, wohl aber in der Menge an gesunden Knollen zutage trat. Dagegen zeigten die geschwefelten Parzellen nicht nur einen hohen Prozentgehalt gesunder Knollen, sondern auch eine starke Steigerung der Gesamternte. Die Versuche wurden im Jahre 1913, das der Entwicklung der Krankheit außergewöhnlich günstig war, weiter fortgesetzt. Dabei kam Kreosolschwefelsäure (5-proz., 100 l auf 1 a) zur Verwendung, die aber bei den besonders ungünstigen Verhältnissen des Jahres 1913 vollständig versagte. Dagegen hatte die Schwefelung nicht nur auf die Gesamternte, sondern auch auf die Menge der gesunden Knollen günstig abgeschnitten. Der Schwefel stellt also zweifellos ein äußerst wirksames Bodendesinfektionsmittel gegen den Kartoffelkrebs dar, das auch bequem und ungefährlich ist. Bei Verwendung stärkerer Schwefelmengen tritt allerdings stellenweise eine Ätzung der jungen Knollen ein, doch sind diese Verletzungen ohne wesentlichen Einfluß. Möglicherweise kann durch eine Kombination von Winter- und Frühjahrsbehandlung oder eine solche von Schwefel und Kalk Abhilfe geschaffen werden und soll dies durch weitere Versuche verfolgt werden. Von Wichtigkeit ist weiter, ob die Schwefelung bis in das nächste Jahr nachwirkt und ob der Erfolg durch eine wiederholte Behandlung gesteigert werden kann. Größere Erfahrungen liegen noch nicht vor, doch scheinen Schwefelungen mit größeren Mengen tatsächlich nachzuwirken, ferner ist auch eine Rentabilität der Schwefelung vorhanden. Ob es mit der Schwefelung allein gelingt, bei der Häufigkeit des Kartoffelbaues auf den Arbeiterländereien den Krebs ganz zu beseitigen, muß vorläufig dahingestellt bleiben, doch wenn man sie mit dem zeitweiligen Anbau weniger anfälliger Kartoffelsorten kombiniert, so ist es immerhin wahrscheinlich, daß man auf diesem Wege ohne besondere Änderungen in der bisherigen Bewirtschaftung verseuchte Äcker in kurzer Zeit reinigen kann. Ferner könnte vielleicht auch durch Schwefelung des Bodens unter den Zwischenfrüchten der Gesundungsvorgang beschleunigt werden. Stift (Wien).

Müller, H. C., Molz, E. u. Morgenthaler, O., Über Brandbekämpfung und den Einfluß der Bestellzeit beim Sommerweizen auf dessen Ertrag und Gesundheit. (Die landw. Versuchs-Stat. Bd. 83. p. 211—220.)

Das Problem der Flugbrandbekämpfung des Weizens und der Gerste ist zwar im Prinzip durch die Heißwasserbeize gelöst, doch kann ein Verfahren, bei dem eine Temperatursteigerung von 1° Wärme eventuell schon imstande ist, erhebliche Schädigungen der Keimkraft herbeizuführen, nicht ohne Vorbehalt der Praxis in die Hand gegeben werden. Verff. suchten nun nach Methoden, den Flugbrand auf weniger gefährlichem Wege zu bekämpfen. Die Resultate waren nicht allzu erfreulich. Es scheint, daß das Prinzip der fraktionierten Sterilisation einige Aussicht auf Erfolg eröffnet. Die Hiltnersche Erfahrung, daß Sublimatbehandlung die Keimung verzögert und es dem Flugbrandpilz ermöglicht, mit dem Wachstum der Nährpflanze besser Schritt zu halten, wurde von den Verff. bestätigt. — Der Brandkäfer Phalacrus corruscus Panz. nährt sich zwar von Brandsporen, trägt aber zur Verbreitung derselben durch Verschleppung bei und muß daher zu den Schädlingen gerechnet werden.

Von großem Einfluß auf den Ertrag und den Befall durch Steinbrand, Flugbrand, Helminthosporium und Weizenhalmfliege (Chlorops taeniopus) ist die Bestellzeit bei Sommergerste und Sommerweizen. Der Befall der Gerste durch Helminthosporium war bei späterer Aussaat geringer, dagegen zeigte der Flugbrand eine steigende Befallgröße, die um so größer war, je später die Aussaat vorgenommen wurde. Besonders stark machte sich der Einfluß der Saatzeit auf den Befall durch Chlorops bemerkbar. Die am 9. März besäte Parzelle wies 89, die am 23. März besäte 420, die am 10. April besäte 1772 Chlorops-Ähren auf. — Aus einer späten Saat des Sommerweizens resultiert aber als weiterer Nachteil noch die mangelhafte Keimfähigkeit des Ernteproduktes. Je später der Sommerweizen gesät wurde, um so geringer war die Keimfähigkeit des Ernteproduktes. Die Keimfähigkeit des Sommerweizens aus Chlorops-Ähren war ebenfalls geringer als die aus normalen Ähren.

W. Herter (Berlin-Steglitz).

Bakteriologische und gärungsphysiologische etc. Institute, Laboratorien etc.

Lüstner, G., Bericht über die Tätigkeit der pflanzenpathologischen Versuchsstation. (Bericht der Kgl. Lehranst. f. Wein-, Obst- u. Gartenbau zu Geisenheim a. Rh. 1912. p. 140—167.)

Mit Ausnahme einer Mitteilung über eine Fusarium-Erkrankung von Koniferenveredlungen (Chamaecyparis **Lawsoniana** und Thuja occidentalis) befaßt sich der vorliegende Bericht ausschließlich mit der Biologie und Bekämpfung schädlicher Insekten. Das Hauptkapitel, über welches im Folgenden etwas ausführlicher referiert werden soll, ist dem gegenwärtigen Stande der Heu- und Sauerwurmfrage gewidmet. Im Gegensatz zu Schwangart vertritt Lüstner hier, wie schon früher die Ansicht, daß wir im bekreuzten Traubenwickler (Polychrosis botrana) einen neuen Eindringling vor uns haben und nicht eine von alters her einheimische Art. Dieser Schädling sei mit Tafeltrauben oder auch mit Trauben zur Weinbereitung erst in jüngster Zeit aus Südeuropa importiert worden und habe sich in Deutschland über die Spalierreben hinweg in die Weinberge verbreitet. Anfangs der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden aus Italien Trauben zur Champagnerbereitung in den Rheingau eingeführt, welche förmlich von Sauerwürmern (wahrscheinlich botrana) wimmelten. Auch der einbindige Traubenwickler (Clysia ambiguella) ist nach der Ansicht des Verf. „allem Anscheine nach aus dem Süden zu uns gekommen.“ Hübner kennt ihn 1796 nur aus Italien und auch Treitschke gibt noch 1829 an, daß er vorwiegend in diesem Lande vorkommt.

Verf. unterwirft die bisherigen Bekämpfungsmittel gegen die Traubenwickler einer scharfen Kritik und beantwortet die Frage, ob wir gegenwärtig eine einfache und leicht durchführbare Methode, welche sich für die Praxis eignet, hätten, verneinend. Wohl gebe es wirksame Bekämpfungsmethoden, aber ihre Verwendung verursache zu große Kosten, und ein Erfolg trete nur dann ein, wenn alle Besitzer einer Gemarkung in gleicher Weise vorgehen. Dazu fehle es aber wiederum an den nötigen Arbeitskräften. Die einzigen Maßnahmen, welche Verf. mit gutem Gewissen empfehlen kann, sind das Auslesen der Heuwürmer aus den Gescheinen und das Auslesen der Wurmbeeren aus den Trauben. Ihrer Umständlichkeit wegen eignen sie sich aber auch nur für die bessern Lagen.

Auch von der Hilfe der insektenfressenden Vögel und der pflanzlichen und tierischen Traubenwicklerparasiten verspricht sich Lüstner keinen durchschlagenden Erfolg. Die Isarien z. B. sind „überall in den Weinbergen vorhanden, wenn auch in verschiedener Stärke. Sie haben also stets Gelegenheit, auf die Puppen überzugehen und ihre uns nützliche Tätigkeit zu entfalten, allein sie tun es nicht immer, sondern nur zeitweise, und zwar nur dann, wenn es ihnen die Witterungsverhältnisse und wahrscheinlich auch eine besondere Empfindlichkeit der Puppen ermöglichen. Sie kommen und wirken dann ganz von selbst, während wir im umgekehrten Falle sie millionenweise in die Weinberge bringen können, ohne auch nur eine Spur von einer Wirkung zu erzielen.

Genau dasselbe gilt für die tierischen Schmarotzer der beiden Traubenwickler. So sehr uns ihre Hilfe bei dem Kampfe gegen dieselben erwünscht ist, dürfen wir nicht ständig mit ihnen rechnen. Auch sie finden sich stets in den Weinbergen vor, allein zu einer stärkeren Vermehrung kommen sie nur dann, wenn ihnen die Natur hierzu die Möglichkeit bietet. Wie man aus bei anderen Insekten beobachteten Verhältnissen schließen kann, scheint dies der Fall zu sein, zu einer Zeit, in der die Würmer zu einer sehr starken Vermehrung gekommen und für den Befall besonders empfindlich geworden sind . . . Jedenfalls spielen bei dem Befall der verschiedenen Stadien der Traubenwickler bestimmte, uns noch nicht bekannte Verhältnisse eine Rolle, die wir ebensowenig zu beeinflussen imstande sein werden, wie diejenigen, die ihre Infektion durch die Pilze ermöglichen. Ich meine, wir könnten bei all diesen Fragen mehr aus den früheren deutschen, als aus den neueren amerikanischen Versuchen lernen, auf welch letztere jetzt von einigen Seiten so vielverheißend hingewiesen wird. Die umfangreichen Versuche, die vor Jahren zur Bekämpfung der Nonne mit ihren natürlichen Feinden ausgeführt worden sind, haben alle zu einem Erfolge nicht geführt und ich fürchte, daß auch die nach dieser Richtung hin eingeleitete Bekämpfung des Heu- und Sauerwurmes mit einem negativen Resultate endigen wird; sie hat meines Erachtens kein praktisches, sondern nur wissenschaftliches Interesse. Sie muß selbstverständlich fortgesetzt werden, damit die Zeit zeigen kann, was von ihr zu halten ist.“

Den Winzern gleichzeitig das Abreiben der Stöcke gegen die Winterpuppen und die Schonung der Parasiten der letztern anzuraten hält Lüstner für verfehlt, weil die eine Maßregel die andere ausschließe. Verf. kommt zum Schlusse, daß wir den Traubenwicklern gegenwärtig noch ziemlich machtlos gegenüberstehen und daß eine allgemeine Einführung von Bekämpfungsmaßnahmen, wie sich in der Pfalz gezeigt habe, vorläufig noch auf zu große Schwierigkeiten stoße. Verf. meint, man sollte vor allem ein

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Schreckmittel zu finden suchen, durch welches die Motten abgehalten und dadurch verhindert würden, ihre Eier auf die Reben abzulegen. Denn dadurch werde jeder Winzer in seinem Vorgehen vom Nachbar unabhängig.

Gewiß enthalten diese in einzelnen Punkten allerdings doch wohl zu pessimistisch gehaltenen Ausführungen manche treffende Bemerkung; denn darin, daß die Traubenwicklerfrage noch nicht endgültig gelöst ist, sind sicher alle Interessenten einig.

Ein weiterer Abschnitt des vorliegenden Berichtes teilt eine Beobachtung über das Vorkommen von botrana-Raupen in weißen und schwarzen Johannisbeeren mit. Des weiteren berichtet der Verf. über das erste schädliche Auftreten von Nysius senecionis, einer Wanze im deutschen Weinbaugebiet. Das Insekt lebt vorwiegend auf Weinbergsunkräutern, besonders auf Senecio vulgaris, von wo aus es als Gelegenheitsschädling auch die Reben heimsucht. Wahrscheinlich wird die Wanze bald wieder verschwinden. Von anderen Beobachtungen seien hier noch erwähnt, der Nachweis des Buchenspringrüßlers (Orchestes fagi) als Schädling an Apfel- und Kirschbäumen, das Vorkommen der Blutlaus (Schizoneura lanigera) auf Cotoneaster horizontalis, sowie die Erzeugung zahlreicher Schälwunden an Obstbäumen durch Otiorrhynchus singularis.

Schneider-Orelli (Wädenswil).

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Gratz, O. und **Vas, K.**, Die Mikroflora des Liptauer Käses und ihre Rolle beim Reifen und Scharfwerden desselben, p. 481.
Green, H. H., Investigations into the Nitrogen Metabolism of Soil, p. 577.
Hanzawa, J., Einige Beobachtungen über Stickstoff-Bindung durch Azotobakter in stickstoffarmen und in stickstoffreichen Substraten, p. 573.
Koch, Alfred, Über die Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes auf den Boden und die ihn bewohnenden Pflanzen, p. 545.
Lemmermann, O. und **Wichers, Jhr. L.**, Verlauf der Denitrifikation in Böden bei verschiedenem Wassergehalt, p. 608.
Sherman, J. M., The Number and Growth of Protozoa in Soil, p. 625.

Referate.

Löhnis, F.. Zur Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau, p. 632.
Reuter, O. M., Lebensgewohnheiten und Instinkte der Insekten bis zum Erwachen der sozialen Instinkte, p. 633.
Theißen, F., Über Membranstrukturen bei den Mikrothyriaceen als Grundlage für den Ausbau der Hemisphaeriales, p. 631.
Wehmer, C., Holzansteckungsversuche mit Hausschwamm, p. 633.

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien etc.

Müller, H. C., **Molz, E.** und **Morgenthaler, O.**, Über Brandbekämpfung und den Einfluß der Bestellzeit beim Sommerweizen auf dessen Ertrag und Gesundheit, p. 637.
Spieckermann, Bemerkungen zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses, p. 636.
Steffenhagen, K., Über die Behandlung des Trinkwassers mit Chlorkalk, p. 635.

Referate aus bakteriologischen und gärungsphysiologischen etc. Instituten, Laboratorien etc.

Lüstner, G., Bericht über die Tätigkeit der pflanzenpathologischen Versuchsstation, p. 638.

Abgeschlossen am 30. Juni 1914.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. No. 24|25.
Ausgegeben am 29. August 1914.

Nachdruck verboten.

Kausal-analytische Versuche über den Ursprung des Chromatins der Sporen und vegetativen Individuen der Bakterien.

[Vorläufige Mitteilung aus dem Institut für allgemeine Biologie und experimentelle Morphologie der böhmischen medizinischen Fakultät in Prag.]

Von Prof. Dr. **Vlad. Ruzicka.**

Mit Hilfe einer neuen Methode konnte ich (17[1]) zeigen, daß die sogen. reifen Sporen Chromatin, und zwar in einer Form enthalten, in welcher Meyer u. a. den Kern der Bakterien abbilden. In derselben Arbeit habe ich weiterhin zeigen können, daß das Sporenchromatin infolge des Alterns der Spore seine Azidität vermindert. Nach den landläufigen Begriffen entspricht das Chromatin den Nukleoproteïden. Stellt das Chromatinkorn der Spore einen Kern dar, so müßte der Aziditätsverlust als Abnahme der saueren Komponente des Nukleoproteïdes gedeutet werden, und es wäre der Schluß zu ziehen, daß der Sporenkern infolge des Alterns seine Nukleïn- (oder Phosphor-) Säure einbüßt. Verhält sich das so, so würde der Sporenkern im Gefolge des Alterns seine charakteristischste Komponente, welche eben den chemischen Charakter der Nukleoproteïde bedingt, verlieren. Ein Kern ohne Nukleoproteïd könnte freilich, gemäß dem nunmehrigen Stande der Wissenschaft, nicht als ein Vollkern angesehen werden, man könnte nicht zaudern, ihm die Fähigkeit der charakteristischen Kernfunktionen abzusprechen.

In der obzitierten Publikation habe ich weiterhin angeführt, daß 20 Jahre alte Sporen des B. tetani bei Untersuchung mit meiner Methode nicht die geringste Spur eines Chromatingebildes merken lassen. Diese Sporen wurden einem Versuchstier verimpft und dadurch eine tödliche Tetanuserkrankung erzeugt, wodurch der Beweis geliefert wurde, daß die Sporen 1. keimfähig waren und 2. sämtliche Arteigenschaften des B. tetani enthielten. Die im Inokulationseiter des Versuchstieres gebildeten Sporen enthielten wiederum sämtlich Chromatin.

Da ich außerdem noch imstande war, auf Bilder hinzuweisen, welche als Übergangsstadien von der vollen Gegenwart des Chromatins bis zu seinem vollständigen Schwunde aufgefaßt werden konnten, so schloß ich, wie auch schon früher, daß das Altern der Spore einen vollkommenen Schwund ihres Chromatins bedinge, das hierbei zugleich seine Azidität einbüße.

Der Schwund des Sporenchromatins geht in ganz allmählicher Weise vor sich. Ein oder zwei Jahre alte Sporen besitzen, soweit durch die Inspektion festgestellt werden kann, ihr Chromatin noch in gleichem Maße wie Sporen, die eben gebildet worden waren. In Kulturen findet man indes um so mehr völlig chromatinfreie Sporen, je höher ihr Alter ist. Da man aber diese Sporen isoliert nicht zu züchten vermag, so kann — im Hinblick auf die Gegenwart zahlreicher, stets in Überzahl vorhandener chromatinhaltiger Sporen

---

[1] Die in Klammern oder bei den Autorennamen sich befindlichen Nummern beziehen sich auf das am Ende der Mitteilung beigefügte Literaturverzeichnis.

— die Frage, ob sie lebendig sind, nicht entschieden werden. Davon hängt jedoch in mancher Beziehung die Beantwortung der Frage nach der Bedeutung des Sporenchromatins ab.

In Würdigung der hohen, ja in vieler Hinsicht prinzipiellen Wichtigkeit dieses Problems für die allgemeine Biologie, suchte ich Wege zu finden, auf welchen man zur Lösung der Frage des Sporenchromatins in kausaler Beziehung gelangen könnte.

Diesen Weg zu entdecken, ist mir gelungen.

Bringt man frisch gebildete oder besser alte (1—2 Jahre) Sporen in steriles, destilliertes Wasser oder noch vorteilhafter in dünner Schicht auf bouillonfreien Agar (Hungeragar[1]) und hält sie daselbst einige Zeit bei 45° C, so findet man, daß die ursprünglich chromatinhaltigen Sporen dasselbe allmählich einbüßen und schließlich (nach Wochen, oft aber auch schon nur nach Tagen) vollständig chromatinfrei werden[2]).

Es könnte etwa die Meinung auftauchen, daß die Auflösung des Chromatins durch die aus den Sporen ausgeschiedenen Produkte des infolge der erhöhten Temperatur des Mediums gesteigerten Stoffwechsels verursacht worden sein könne. Doch könnte eine solche Annahme durch den Hinweis auf die verhältnismäßig unbedeutende Menge von Sporen, welche in das destillierte Wasser (den Hungeragar) eingebracht wurde, zurückgewiesen werden. Die Verdünnung der Zerfallsprodukte, die ja nur in minimalen Mengen in das Substrat gelangen konnten, war in meinen Versuchen so groß, daß dieselben unmöglich in die Wagschale fallen konnten. Gewiß war ihre Menge unendlich geringer, als z. B. in Kulturen auf Nährsubstraten, auf welchen man der Auflösung des Chromatins trotzdem kaum begegnet.

Es könnte weiterhin angenommen werden, daß in diesen Versuchen entweder eine Autolyse des Chromatins wie in den Experimenten von Oes (9, 10) oder eine Auslaugung desselben durch einfache Wirkung des destilierten Wassers zustande gekommen ist.

Meine Versuchsanordnung differiert freilich von der Versuchsanordnung Oes' und beruht auch, wie ich gleich vorhinein bemerken würde, auf einem ganz anderen Prinzipe.

Oes legte entweder lebende Objekte in Wasser, in welchem Toluol, Chloroform, Karbolsäure, Neutralsalze gelöst waren und beließ sie in demselben bei 32—40°, oder zerrieb Gewebe und legte in das Filtrat, dem wiederum Toluol hinzugefügt wurde, Schnitte von in Alkohol fixierten Geweben. Infolge dieser Eingriffe stellte sich Chromatinauflösung ein und zwar am raschesten auf mitotischen Stadien, am langsamsten in ruhenden Kernen — wie Oes vermutet, durch Einwirkung eines besonderen chromatinolytischen Enzymes.

Im Hinblicke auf meine Versuche sind insonderheit die an erster Stelle erwähnten, also mit lebenden Objekten unternommenen Experimente von Bedeutung. Bei denselben verändern sich jedoch jene lebenden Teile derart, daß sie absterben. Es ist somit nicht sicher, ob der Chromatinverlust nicht eine Folge des Absterbens ist (Nemec, 7). Was die Versuche mit dem Safte zerriebener Gewebe betrifft, so kann freilich auf eine Enzymwirkung geschlossen werden; doch hat diese, an sich sicher sehr interessante Beobachtung für unser Thema keine Bedeutung, weil die Wirkung auf tote Gewebe ausgeübt wurde.

---

[1]) Siehe Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. 30. 1910. Festschr. f. W. Roux. 1. p. 444.

[2]) Die genauen Angaben und vollständigen Beschreibungen erfolgen in der ausführlichen definitiven Arbeit.

Über die Wirkungsweise des kalten oder mäßig erwärmten Wassers besitzen wir sehr wenig Versuche. Fr. Schwarz (18) gibt an, daß sich bei manchen Pflanzen die herauspräparierten meristematischen Kerne in kaltem Wasser auflösen, während die Kerne alter Zellen unverändert bleiben. Heine (3) hat die Mitteilung gemacht, daß sich bei Einbringung von Gewebsschnitten in destilliertes Wasser für einige Wochen die Färbbarkeit ihrer sämtlichen Teile vermindert hat. In allen diesen Versuchen handelte es sich einzig um tote Objekte.

Aus dem Angeführten ist ersichtlich, daß zwischen meinen Versuchen und denjenigen der zitierten Autoren ein großer Unterschied in den Voraussetzungen, Zielen und Ergebnissen besteht. Zu vergleichen wären dieselben nur mit einigen Versuchen von A. Fischer (1), der in gewöhnlichem Wasser die Auflösung der „Mitosen" lebender Cyanophyceen beobachtet hat.

Und selbst wenn man in den Versuchen mit dem destillierten Wasser — obschon, meiner Ansicht nach, mit Unrecht — einen eventuellen auslaugenden Einfluß des Wassers selbst annehmen wollte, so kann doch dieser Einwand bei jenen meinen Versuchen, bei welchen ich den Hungeragar als Substrat benutzt habe, nicht erhoben werden.

Ich will keineswegs behaupten, daß die Auflösung des Chromatins, welche in den im destillierten Wasser (Hungeragar) befindlichen Sporen bei 45° C allmählich herbeigeführt wird, nicht enzymatischen Ursprunges ist, im Gegenteile halte ich das für sehr wahrscheinlich. Ist dies aber der Fall, so muß gefragt werden, was für ein Enzym da wohl eingewirkt habe.

Ziehen wir die Verhältnisse, welchen die Sporen bei meiner Versuchsanordnung ausgesetzt waren, in Betracht, so bemerken wir vor allem, daß sie sich in Medien befanden, welche ihnen keinerlei Nährstoffe boten. Das wird durch den Umstand bewiesen, daß sie nicht keimen, sondern in ihrer Ruhe weiter verharren. Andererseits werden, durch Einbringung der Sporen in ein Medium mit erhöhter Temperatur ihre biochemischen Vorgänge gemäß der Regel van t'Hoffs unstreitig beschleunigt.

Unter den eben geschilderten Umständen: also bei beschleunigten Lebensprozessen und gleichzeitig verhinderter Nahrungsaufnahme, greifen sämtliche bislang daraufhin untersuchte Organismen 1. ihre Reservestoffe, 2. die Baustoffe des eigenen Körpers an.

Bei den Sporen beobachtet man jedoch Chromatinverlust.

Auf Grund des Angeführten wäre es also mit Hilfe meiner Versuchsanordnung möglich festzustellen, ob das Sporenchromatin a) den Körpersubstanzen im Sinne von Protoplasmaverbindungen oder vielleicht b) den Reservestoffen beizurechnen sei.

Was die erstere Möglichkeit anbetrifft, so steht zu erwägen, daß der Chromatinverlust, wie meine Versuche weiterhin gezeigt haben, keineswegs auch den Verlust der Lebensfähigkeit bedeutet[1]), wie man etwa bei einem derartigen, gewiß ganz bedeutenden

---

[1]) Natürlich bis zu einer bestimmten Zeitgrenze, nach deren Überschreitung die den angegebenen Versuchsbedingungen ausgesetzten Sporen ebenso unterliegen, wie andere Organismen der protrahierten Hungerung.

Verluste, wie ihn der Schwund des verhältnismäßig großen Teilchens, welches das Chromatin in der Gesamtspore darstellt, erwarten würde. Denn die chromatinlosen Sporen wachsen üppig auf, sobald man sie auf ein Nährsubstrat überträgt und zwar in der typischen, für jene Art charakteristischen Weise. Die aus denselben hervorgegangenen Bakterien bilden wiederum Chromatin in normaler Weise.

Bereits im Lichte dieser Tatsachen würde die Annahme, daß das Sporenchromatin Protoplasmaverbindungen im Sinne lebender Substanz entspreche, nicht geringen Schwierigkeiten begegnen. Doch muß man die Möglichkeit einer solchen Deutung vorderhand im Auge behalten.

Was die zweite Eventualität anlangt, die Frage nämlich, ob das Chromatin nicht etwa Reservestoffen entspricht, sei es mir gestattet, vor allem auf einige von meinen früheren Angaben aufmerksam zu machen.

Im Jahre 1908 (15) habe ich darauf hingewiesen, daß es nicht ratsam sei, mit der Bezeichnung: Chromatin irgendwelche bestimmte chemische Vorstellungen zu verbinden. Ich sagte damals, daß das einzige Sichere, was mit unseren derzeitigen Methoden festgestellt werden kann, dahin zusammengefaßt werden könne, daß das Chromatin die relativ labileren, das Plastin die relativ stabileren Komponenten der lebenden Substanz darstelle. Das Plastin ist die persistente, die Dauersubstanz, das Chromatin die vergängliche.

Weiterhin habe ich 1909 (16) mitgeteilt, daß das Chromatin in quantitativer Beziehung der Regsamkeit des Stoffwechsels folge. Zur Zeit des regsten Wachstums, also zur Zeit der intensivsten Stoffwandlungen, besitzen die Bakterien die größte Menge Chromatin; zu einer Zeit, wo der Stoffwechsel auf das Minimum herabgesetzt ist, in der alten Spore, gibt es überhaupt kein Chromatin.

Es ist klar, daß meine obzitierten neuen Versuche diese meine früheren Angaben vollauf bestätigen; sie zeigen jedoch weiterhin noch, auf welche Weise jene Erscheinungen beherrscht werden können und enthüllen solchermaßen auch ihre Ursachen.

Diese Behauptung hat nicht bloß für die Sporen Geltung, sondern auch für diejenigen Bakterien, welche keine Sporen bilden. Bereits 1902 (11) habe ich die Mitteilung gemacht, daß ein Teil der vegetativen Bakterien keine Chromatinstrukturen aufweist und bereits damals auf Grund einer Reihe von Indizien geschlossen, daß diese Erscheinung mit dem Stoffwechsel in Zusammenhang stehe.

Neuerdings (1912) habe ich mit Bac. typhi abdom. Versuche unternommen, um diese Frage auf Grund der neu gewonnenen Erfahrungen einer Lösung zuzuführen. Ich habe chromatinhaltige Individuen auf den Hungeragar aufgetragen und in einen auf 45° gebrachten Thermostaten gestellt. Bereits nach verhältnismäßig kurzer Zeit büßen diese Bakterien ihr Chromatin ein; selbstverständlich treten bei verschiedenen Stämmen individuelle Schwankungen ein.

Dieselbe Erscheinung hat Luska (5) bei M. ochraceus festgestellt, indem er auf meine Anleitung hin in analoger Weise durch Hungern vollständig chromatinfreie Individuen erzielt hat.

Von den chromatinlosen Bakterien konnte durch Umimpfung auf ein Nährsubstrat festgestellt werden, daß sie lebendig sind. Sie vermehrten sich unter Bildung von Chromatin in normaler Weise.

Bereits aus diesen Versuchen geht ein auffallender Umstand hervor. Das Chromatin verhält sich in bezug auf seinen kausalen Zusammenhang mit der Regsamkeit des Stoffwechsels ganz parallel den Stoffwechselprodukten.

Von besonderer Wichtigkeit ist bei meinen obzitierten Versuchen der Umstand, daß die Sporen unter den angedeuteten Bedingungen ihr sämtliches Chromatin eingebüßt haben, trotzdem aber keim- und wachstumsfähig geblieben sind.

Ich möchte an dieser Stelle noch auf die Versuche Khainskys (4) über den Einfluß des Hungerns auf Paramaecien aufmerksam machen. Bei diesen Versuchen wurde meine Methode der Vitalfärbung mit Neutralrot und Methylenblau (von 1904) in Anwendung gebracht, und den Ausgangspunkt der Versuche bildete der morphologische Metabolismus des Protoplasmas, den ich in meinen Arbeiten seit 1894, ausdrücklich 1902 und mit theoretischer Begründung 1906/07[1]) proklamiert habe (11, 12, 13, 14).

Khainsky hat die Entdeckung gemacht, daß sich im Verlaufe des Hungerns der Makronukleolus auflöst und dessen Chromatin in Substanzen des „Kernsaftes" umwandelt, bis er vollständig schwindet. Der Mikronukleus bleibt jedoch stets erhalten.

Die Versuche Khainskys unterscheiden sich von den meinen dadurch, daß es ihm nicht gelungen ist, das gesamte Chromatin des Paramaeciums zu entfernen und daß er den Beweis nicht geliefert hat, ob die solchermaßen des Makronukleus entblößten Tiere noch weiterhin lebensfähig sind.

Meine Versuche haben also erwiesen, daß das Chromatin so lange im Organismus bestehen bleibt, so lange irgendwelche Stoffwechselvorgänge in demselben vor sich gehen und daß es unter Verhältnissen, welche ein absolutes Verhungern herbeiführen, vollständig schwindet.

Diese Versuche werfen jedoch auch ein scharfes Licht auf die Frage des Bakterienkernes.

Wollte man die Behauptung aufstellen, daß die Bakterien einen mit dem Kerne wirklicher Zellen homologen Kern besitzen, so müßte man zugeben, daß dieser Kern aus Substanzen besteht, die im Laufe der Stoffwechselvorgänge gebildet und während absoluter Hungerung verbraucht werden und daß dieser Kern also der morphologischen Assimilation nicht unterliegt[2]). Entspricht das Sporenchromatin lebenden Protoplasmabestandteilen, so würde hiermit der morphologische Metabolismus des Protoplasmas als bewiesene Tatsache dastehen.

Es scheint mir jedoch die Annahme viel näher zu liegen, daß in diesem Falle keine Erscheinung des morphologischen Metabolismus des Protoplasmas vorliegt, wenigstens nicht in dem Sinne der Umwandlung einer Form der lebenden Substanz in eine andere.

---

[1]) In diesem Jahre erschien auch die Originalarbeit Khainskys, leider an einem schwer zugänglichen Orte, nämlich in den in russischer Sprache publizierten Arbeiten des zool. Instituts der Universität Warschau (Vorst. Prof. Dr. Mitrophanow).

[2]) Ich möchte an dieser Stelle nur ganz im allgemeinen bemerken, daß die Bezeichnung „morphologische Assimilation" von Roux sich auf die allgemein bekannte Erscheinung bezieht, daß sich die Grundstrukturen und Grundformen der lebenden Substanz stetig erhalten trotz des unaufhörlichen Stoffwechsels, indem mit besonderer „physikalischer" Struktur versehenes Material produziert wird, durch welches das Verbrauchte ersetzt oder Bestehendes vergrößert wird.

Ich glaube, die Überzeugung aussprechen zu dürfen, daß meine Versuche fähig sind, der Diskussion vom Bakterienkern vielleicht ein Ende zu bereiten.

Wenn nämlich das Sporenchromatin den Kern darstellen würde, so wäre es, meinen Versuchen gemäß, möglich, durch Hungerung aus der Spore die Erbsubstanz zu entfernen.

Der Chromatinschwund ist jedoch, wie ich oben erwiesen habe, von keinerlei schädlichen Folgen für die Vererbung begleitet, obwohl er in dem als Vererbungsträger fungierenden Gebilde vor sich geht. Die Erbsubstanz wird also durch das Hungern, infolgedessen das Chromatin schwindet, keineswegs entfernt. Es bleibt somit nichts anderes übrig, als zu schließen, daß das Sporenchromatin kein propagatives Chromatin darstellt und somit auch kein Kern ist. Man würde denn die Vorstellung vorziehen, daß der Sporenkern einzig und allein aus „Tropho-Chromatin" besteht, welches sich den herrschenden Theorien gemäß in quantitativer Beziehung den vegetativen Vorgängen parallel verhält (Goldschmidt), da ein anderes Chromatin nicht vorhanden ist. Dann aber wäre es notwendig, das Chromatin der vegetativen Individuen zu erklären, dann müßte für das obzitierte Verhalten der keine Sporen bildenden Bakterien eine Erklärung herbeigeschafft werden und dann wäre schließlich das als Vererbungsträger fungierende Gebilde (die Spore) frei von Vererbungssubstanz!

Es wäre doch gewiß sehr eigentümlich, wenn unter solchen Verhältnissen das Chromatinkorn der Spore (Meyer) oder irgendeines von den Körnern des Bakterienprotoplasten (Nemec) den Kern vorstellen sollte.

Es kann wohl mit Recht bestritten werden, daß die Organismen im Falle absoluter Hungerung gerade ihre Vererbungssubstanz angreifen würden. Viel näher liegt die Annahme, daß die Bakterien ähnlich wie andere Organismen unter solchen Umständen vor allem ihre Reservestoffe angreifen.

Die prinzipielle Bedeutung meiner angeführten Versuche spiegelt sich auch in ihren weiteren Konsequenzen.

Es dürfte sich nämlich als notwendig erweisen, daß man die Chromatinstrukturen überhaupt einer näheren kausalen Untersuchung in bezug auf ihren Zusammenhang mit den Stoffwechselvorgängen unterzöge, um die eigentliche Natur dieser Strukturen festzustellen.

Denn, während die bisherigen Untersucher, welche auf die Parallelität zwischen der Menge des Chromatins und der Nährtätigkeit der Zelle aufmerksam geworden sind, das Verhältnis beider so aufgefaßt haben, daß das Chromatin die trophische Funktion beherrsche event. die Nahrungssubstanzen umwandle, zeigen meine Versuche, daß die Dinge gerade umgekehrt liegen, daß nämlich das Chromatin ein Produkt der Stoffwechselvorgänge der lebenden Substanz bildet.

Wer die Analogien, welche die Chromatinstrukturen verschiedenster Organismen im Laufe unterschiedlicher Lebensvorgänge bieten, ohne vorgefaßte Meinung einer Analyse unterzieht, wird wohl kaum mehr noch die sonst allgemeine Meinung, welcher Heidenhain (2) dadurch Ausdruck gab, daß er das Chromatin als Symbol für gewisse Teile des lebenden

Kernprotoplasmas bezeichnet hat, in ihrem ganzen Umfange verteidigen können; er wird sich kaum des immer mehr sich aufdringenden Gedankens erwehren können, daß wohl ein großer Teil dieser Gebilde mit dem Stoffwechsel in direktem kausalen Zusammenhang steht.

Eine Reihe von auf dieses Thema Bezug habenden Arbeiten aus meinem Institute sieht der Vollendung entgegen und dürfte den Fachkollegen in kurzer Zeit vorgelegt werden.

Literatur.

1. Fischer, Die Zelle der Cyanophyceen. (Bot. Zeitg. Bd. 63. 1905.)
2. Heidenhain, Plasma und Zelle. I. Jena 1907.
3. Heine, Die Mikrochemie der Mitose. (Zeitschr. f. physiol. Chem. 21. 1895.)
4. Khainsky, Physiol. Untersuchungen über Paramaec. cand. (Biol. Centralbl. 30. 1910.)
5. Luska, Morph.-biol. Studien über die färbbaren Körner im Inhalte des M. ochraceus. (Arch. f. Prot. Bd. 33. 1914.)
6. Meyer, Zelle der Bakterien. Jena 1912.
7. Nemec, Anat. u. physiol. rostlin. I. Prag 1907.
8. —, Das Problem der Befruchtungsvorgänge. Berlin 1910.
9. Oes, Über die Autolyse der Mitosen. (Bot. Ztg. 1908.)
10. —, Neue Mitteilungen über enzymatische Chromatolyse. (Zeitschr. f. Bot. 1910.)
11. Ruzicka, Biol. Bed. der färbbaren Körnchen des Bakterieninhaltes. (Arch. f. Hyg. 42. 1903.)
12. —, Der morphologische Metabolismus des lebenden Protoplasmas. (Arch. f. Entwicklungsmechan. 21. 1906.)
13. —, Struktur und Plasma. Wiesbaden (Bergmann) 1907.
14. —, Zur Kenntnis der Natur und Bedeutung des Plastins. (Arch. f. Zellf. I. 1908.)
15. —, Das Chromatin und Plastin in ihren Beziehungen zur Regsamkeit des Stoffwechsels. (Festschr. f. R. Hertwig. 1. 1910.)
16. —, Eine Methode zur Darstellung der Struktur fertiger Bakteriensporen usw. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36. 1912.)
17. Schwarz, F., Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Breslau 1887.

Nachdruck verboten.

Flüchtige organische Verbindungen als einzige Kohlenstoffquellen.

Vorläufige Mitteilung.

Von **Max Grimm**, Helsingfors,
Botanisches Laboratorium der Universität.

Es ist oft beobachtet worden, daß sich in Nährlösungen, die keine Kohlenstoffquelle enthalten und vor Verunreinigung nicht geschützt sind, Schimmelpilze entwickeln können, wobei nicht selten kräftige Mycelbildung und auch Hautbildung eintritt. In solchen Fällen können nur flüchtige organische Stoffe, die sich zufällig in der Laboratoriumluft befinden, als Kohlenstoffquellen in Frage kommen.

Ich stellte es mir zur Aufgabe, verschiedene organische Stoffe mit niedrigem Siedepunkt in dieser Richtung zu studieren und wählte als Versuchsobjekt den sog. Milchschimmel (Oospora lactis), der unter günstigen Nahrungsbedingungen eine kräftige weiße Haut auf der Oberfläche des Nährsubstrates bildet und zugleich gutes, submerses Wachstum zeigt. Zum Vergleich zog ich noch den Aspergillus repens heran.

Die Versuche wurden mit 41 organischen Verbindungen ausgeführt, deren Dämpfe durch ein gebogenes Glasrohr aus kleinen, hermetisch verschlossenen Zylindern, in denen sich die entsprechenden Flüssigkeiten befanden, in die Kolben gelangten. Die Nährlösung enthielt 0,5 g Dikaliumphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat und 5 g Ammonsulfat in 1000 ccm dest. Wassers. Als Kulturkolben wurden 200 ccm Erlenmeier-Kolben benutzt, die mit je 30 ccm Nährlösung beschickt wurden.

Die Resultate wurden am 7., 14. und 21. Tage nach Aussaat einer Platinöse Impfmaterials notiert. Die folgende Tabelle bezieht sich auf den 21. Tag:

Pentan	Keine Assimilation, unbedeutendes Wachstum wie in den Kontrollkolben
Hexan	do.
Heptan	do.
Octan	do.
Methylalkohol	do.
Äthylalkohol	Gutes Wachstum, Hautbildung und submerses Mycel.
Propylalkohol	do.
Isopropylalkohol	Keine Assimilation.
Butylalkohol	do.
Isobutylalkohol	Sehr gutes Wachstum, kräftige Hautbildung.
Butylalkohol tertiär	Keine Assimilation.
Amylalkohol	Merkbare, jedoch schwache Assimilation.
Ameisensäure	Keine Assimilation.
Essigsäure	Gutes Wachstum.
Propionsäure	Keine Assimilation.
Buttersäure norm.	do.
Isobuttersäure	do.
Valeriansäure	do.
Äthyläther	Gutes, hauptsächlich submerses Wachstum.
Propyläther	Merkbare Assimilation.
Formaldehyd	Keine Assimilation.
Azetaldehyd	do.
Propylaldehyd	do.
Ameisensaures Methyl	Rasch verdampft, Resultat unbestimmt.
,, Äthyl	do.
,, Propyl	Sehr gutes Wachstum, sehr kräftige Hautbildung.
,, Isobutyl	do.
Essigsaures Methyl	do.
,, Äthyl	do.
,, Propyl	do.
,, Isobutyl	Gutes Wachstum.
,, Amyl	do.
Azetessigsaures Äthyl	keine Assimilation.
Malonsaures ,,	do.
Bernsteinsaures ,,	do.
Oxalsaures ,,	do.
Methyljodid	do.
Äthyljodid	do.
Äthylbromid	do.
Propylbromid	do.
Chloroform	do.

Die Ergebnisse meiner Versuche fasse ich in folgender Weise zusammen:

1. Oospora lactis besitzt, wie auch andere Schimmelpilze, die Fähigkeit, verschiedene flüchtige organische Verbindungen als einzige Kohlenstoffquelle auszunutzen, doch müssen diese Verbindungen 3 Organogene C, H^2 und O enthalten, um assimilierbar zu sein.

2. Die Assimilation des Kohlenstoffes geht gleichzeitig mit derjenigen des Sauerstoffes und des Wasserstoffes vor sich. Weder das C, noch das O der

Karbonylgruppe scheinen assimilierbar zu sein, wohl aber das O der Hydroxylgruppe.

3. Weder die Kohlenwasserstoffe noch ihre Halagenderivate können in flüchtigem Zustande als C-Quellen ausgenutzt werden (vgl. 1).

4. Die Alkohole sind in verschiedenem Grade assimilierbar, wobei sich keine Bevorzugung der Alkohole mit normaler Kette feststellen läßt. So gibt Proylalkohol gutes Wachstum, Isopropylalkohol kaum merkbares, dagegen Butylalkohol keine Assimilation, Isobutylalkohol sehr gutes Wachstum. Für Aspergillus repens ist das Verhältnis zwischen Butyl- und Isobutylalkohol ein umgekehrtes.

5. Von den Fettsäuren gibt nur Essigsäure gutes Wachstum. Ameisensäure ist nicht assimilierbar (vgl. 2).

6. Hervorragende Effekte geben ameisensaure und essigsaure Ester, die in hohem Grade assimilierbar sind, dagegen geben die Ester der zweiwertigen Säuren negative Resultate. Aspergillus repens kann aber oxalsaures Amyl ausnutzen.

7. Die Aldehyde der drei ersten Fettsäuren geben negative Resultate.

8. Äthyläther und Propyläther sind assimilierbar, ersteres in recht hohem Maße, wobei aber das Wachstum hauptsächlich submers ist.

9. Es besteht ein merkbarer Unterschied zwischen Oospora lactis und Aspergillus repens in der Ausnutzungsfähigkeit flüchtiger C-Verbindungen.

10. Die Ausnutzung der in der Laboratoriumsluft befindlichen, flüchtigen organischen Stoffe müßte bei ernährungsphysiologischen Untersuchungen als mögliche Fehlerquelle in Betracht gezogen werden.

Die nähere Beleuchtung dieser Ergebnisse, sowie weitere Ausführungen in derselben Richtung behalte ich mir für eine größere Arbeit über die Ernährungsphysiologie der Oospora lactis, die in nächster Zeit erscheinen soll, vor.

Herrn Prof. Dr. F. Elfving, der mir gastfreundlich sein Laboratorium und die Mittel desselben zur Verfügung gestellt hat, erlaube ich mir hier meinen innigsten Dank auszusprechen.

Nachdruck verboten.

Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur.

[Aus dem mikrobiologischen Laboratorium der Technischen Hochschule zu Delft.]

Von **A. Krainsky**, Kiew (Rußland).

Mit 2 Tafeln und 4 Textfiguren.

Einleitung 649
Kap. 1. Literatur 650
Kap. 2. Anhäufungs- und Separationsmethoden 656
Kap. 3. Morphologie 660
Kap. 4. Physiologie 668
Kap. 5. Systematisches 677

Einleitung.

Wird ein Organismus in der Natur gefunden, so pflegt man ihm zuerst seinen Platz in dem System anzuweisen. Doch nicht nur über seinen Platz im System, sondern auch über seine Bedeutung als Teilnehmer an den Lebenserscheinungen der Erde, muß man sich klar werden, wenn man zur vollkommenen Kenntnis eines Lebewesens gelangen will. Um das zu erreichen, hat man nach Tschulok[1]) sieben Fragen zu studieren, die den sieben Disziplinen der Biologie entsprechen:

1. Die Verteilung der Organismen nach Gruppen, entsprechend dem Grade ihrer Ähnlichkeit (Klassifikation, Taxonomie).
2. Die Gesetzmäßigkeit der Gestalt (Morphologie).
3. Die Lebensvorgänge in den Organismen (Physiologie).
4. Die Anpassung der Organismen an die Außenwelt (Ökologie).
5. Die Verteilung der Organismen im Raume (Chorologie).
6. Das zeitliche Auftreten der Organismen in der Erdgeschichte (Chronologie).
7. Die Herkunft der organischen Wesen (Genetik).

Auch für die Mikrobiologie bewahren die meisten von diesen Disziplinen ihre Bedeutung.

Die Frage der Verteilung der Organismen im Raume (Chorologie) hat wegen der Leichtigkeit der Verbreitung für die Mikroben nicht die gleiche Bedeutung, wie für die höheren Organismen, und fällt mit der Frage der Anpassung zusammen. Wenig weiß man auch über das zeitliche Auftreten der Mikroben in der Erdgeschichte (Chronologie, Paläontologie), so daß diese Disziplinen für die Lehre von den Mikroben eine untergeordnete Bedeutung haben.

Es ist hingegen selbstverständlich, welche Bedeutung die Fragen über die Klassifikation, Morphologie und Physiologie für die Mikroben, sowie überhaupt für alle Organismen haben. Die Frage der Anpassung der Mikroben an die Außenwelt (Ökologie) wird unter Benutzung der Elektions- und Anhäufungsmethoden studiert, und dieses Studium ergibt nicht nur wichtige diagnostische Artenmerkmale, sondern dient auch als ein Mittel bestimmte Arten zu erhalten.

Von großer Wichtigkeit für die Kenntnis der Mikroben ist die Frage der Genetik, insbesondere seitdem man bei ihnen die Mutationserscheinungen beobachtet hat. Mit dieser letzteren Frage habe ich mich aber beim Studium der Aktinomyceten bisher nur wenig beschäftigt; sie soll den Gegenstand spezieller, von mir demnächst vorzunehmender Untersuchungen bilden.

Kapitel 1.

Literatur.

Mehr als 30 Jahre lang sind die Aktinomyceten bekannt. Sie sind von den medizinischen Bakteriologen viel studiert worden, da viele von diesen Organismen für Menschen und Tiere pathogen sind. Doch ist die Kenntnis dieser Organismengruppe ganz unvollkommen. In der umfangreichen Literatur über die Aktinomyceten finden wir z. B. sehr wenig über deren physiologische Eigenschaften; die Beschreibungen der Arten sind einander so ähnlich, daß man den Eindruck erhält, daß es keine guten Merkmale für die verschiedenen Arten gibt. Endlich ist die Terminologie bis jetzt noch nicht endgültig festgelegt. Man hat sehr viele Aktinomycetenarten in der Natur gefunden, ohne zu wissen, welche Rolle sie spielen, da die Frage immer nur im Zusammenhang mit ihrer Pathogenität und ihrer hygienischen Bedeutung studiert wurde.

---

[1]) Tschulok, S., Das System der Biologie. Forschung und Lehre. Jena 1910. p. 197.

Die Aktinomyceten sind zuerst von Cohn[1]) gefunden worden, der unter dem Namen Streptothrix Foersteri einen bakterienähnlichen Organismus, aber mit verzweigtem Mycelium, beschrieben hat. Einen solchen Organismus hat Bollinger[2]) in den Vieh-Aktinomykosegeschwülsten gefunden, und ihm wegen seiner strahligen Form den Namen Actinomyces gegeben.

Man verwechselte die Aktinomyceten mit anderen Mikrobengruppen, was ihre systematische Stellung beeinträchtigte und zu einer Verwirrung in der Namengebung führte, so daß mit den Namen Actinomyces, Streptothrix, Cladothrix und Oospora eine und dieselbe Art bezeichnet wurde.

So haben Savageau und Radais[3]) die Aktinomyceten mit der Hyphomycetengattung Oospora identifiziert. Diese Gattung unterscheidet sich aber von den Aktinomyceten nicht nur durch ihre Größe, sondern auch durch eine Reihe von morphologischen Eigenschaften, wie z. B. die Struktur der Hyphen, die bei Oospora aus kurzen Zellen bestehen. Auch die Eigenschaften des Plasmas und der Zellwand der Oospora sind durchaus von denen der Aktinomyceten verschieden, was schon Laehner-Sandoval[4]) bemerkt hat.

Migula[5]) sowie Macé[6]) geben den Aktinomyceten den Namen Cladothrix, stellen also diese beiden, sich nach der Art der Verzweigung unterscheidenden Organismen, in eine und dieselbe Gruppe. Es gibt aber bei den Aktinomyceten keine pseudodichotomischen Verzweigungen, wie sie die Cladothrix-Gruppe charakterisieren, und auch keine dichotomischen Verzweigungen, hingegen bildet das Mycelium der Aktinomyceten ein monopodiales System.

Petruschky[7]) vereinigt unter dem Familiennamen Trichomyceten alle haarfeinen Pilze und teilt dieselben in die Gattungen Aktinomyces, Streptothrix, Cladothrix und Leptothrix ein. In diesem System sind die sich nach der Art der Verzweigung unterscheidenden Organismen einer Gruppe zugezählt, so daß eine sehr wichtige Eigenschaft, die diese Organismen von den Bakterien zu trennen gestattet, bei solch einer Klassifikation ohne jede Bedeutung ist. In dem System von Petruschky finden wir einen Unterschied zwischen den Gattungen Actinomyces und Streptothrix. Zu Actinomyces rechnet er solche Formen, die im lebenden Körper Strahlenkranzformen bilden, zu Streptothrix aber solche, die durch reichliche echte Verzweigungen, welliges Wachstum, späte Fragmentation und Bildung von Konidienketten charakterisiert sind. Da das Zerfallen der Hyphen in stäbchenähnliche Gebilde, sowie die Konidienbildung die Merkmale der grauen Aktinomyceten-Gruppe bilden, d. h. sowohl für die pathogenen, als auch für die nichtpathogenen Arten charakteristisch sind, so bleibt für die Trennung des Genus Actinomyces nur die Strahlenform im Tierkörper übrig, so daß man diese Organismen viel besser zu Actinomyces rechnet.

---

[1]) Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. 1875.

[2]) Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1877. No. 27.

[3]) Sur le genre Cladothrix etc. (Ann. de l'Inst. Past. 1892. p. 242.)

[4]) Über Strahlenpilze. Straßburg i. E. 1898. p. 60.

[5]) System der Bakterien.

[6]) Traité pratique de Bactériologie. 6me éd. 1913.

[7]) Kolle u. Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorgan. Bd. 4. p. 267; 5. p. 301.

Lehmann und Neumann[1]), die die Aktinomyceten mit den Corynebakterien und Mykobakterien zu einer Familie „Actinomyces“ vereinigen, haben damit der Systematik einen neuen Weg gewiesen. Die noch jetzt bestehende Verwirrung der Namen sollte, nachdem Lehmann und Neumann eine vollkommene Präzisierung des Namens „Actinomyces“ in ihrem Buch gegeben haben, aufhören. Lehmann und Neumann betrachten die Aktinomyceten nicht als zu den Spaltpilzen gehörende Organismen, sondern als eine ganz besondere Gruppe, die zwischen den Hyphomyceten und Schizomyceten steht, oder geradezu den niederen Hyphomyceten zugezählt werden muß. Den Schizomyceten sollen sie sich ihrer Fadendicke und den Eigenschaften ihres Protoplasmas nach nähern, den Hyphomyceten nach der Verzweigung und nach den Lufthyphen mit konidienähnlichen Gebilden.

Die ganze Actinomyces-Gruppe, die sich durch ihre Verzweigungen von den Bakterien unterscheidet, wird in 3 Gattungen geteilt: 1. Corynebacterium, 2. Mycobacterium und 3. Actinomyces. Die letzterwähnte unterscheidet sich von den Mykobakterien, die verzweigtes Mycel und actinomycetenähnliche Kolonien bilden, und wie die Aktinomyceten unbeweglich sind, durch Bildung eines Luftmycels, von dem die Luftsporen sich abschnüren, die für die Verbreitung der Organismen sorgen.

Sowohl die Aktinomyceten, als auch die Mykobakterien sind in der Natur sehr verbreitet, wie jüngst Söhngen[2]) gezeigt hat.

Für die systematische Zusammenstellung der Aktinomyceten mit den Mykobakterien hat man den Färbungsverhältnissen große Bedeutung beigelegt. Die Aktinomyceten färben sich mit gewöhnlichen Bakterienfarben und sind Gram-positiv; hinsichtlich der Säure- und Alkoholfestigkeit findet man hingegen, daß diese Eigenschaften nicht immer deutlich ausgeprägt erscheinen.

Festmantel[3]), Fuchs[4]) und Abbot und Gildersleeve[5]), die diese Frage speziell studiert haben, sind zu dem Schlusse gekommen, daß die Aktinomyceten säurefest sind. Doch finden wir viele Beispiele von nicht säurefesten Aktinomyceten. Die Säurefestigkeit des Tuberkuloseerregers wird durch seinen Fett- und Wachsgehalt erklärt, also durch die chemischen Eigenschaften seines Zellinhalts, die nicht so wichtig für die systematische Stellung dieses Organismus sind, wie seine morphologischen Eigenschaften.

Die von mir untersuchten Aktinomyceten besitzen auf Zucker- oder Ca-Malat-Nährböden keine Säure- oder Alkoholfestigkeit, doch stehen sie ihren morphologischen Eigenschaften nach der Mykobakteriengruppe sehr nahe, so daß sie unter gewissen Wachstumsbedingungen den letzteren sehr ähnlich sind.

Die morphologischen Eigenschaften der Aktinomyceten sind besonders von Lachner-Sandoval[6]) und Neukirch[7]) studiert worden.

---

[1]) Atlas und Grundriß der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. München 1912.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1911.

[3]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 31. 1902.

[4]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 33. 1903.

[5]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 31. 1902.

[6]) Über Strahlenpilze. Straßburg i. E. 1898.

[7]) Über Strahlenpilze. Stsaßburg i. E. 1902.

Lachner-Sandoval, der, wie schon gesagt, die Verzweigungsart studiert hat, beobachtete einen Zerfall des Plasmas in den alten Hyphen, der darin besteht, daß der Protoplasmainhalt sich durch Konzentration an einzelne Stellen zurückzieht und andere Stellen frei läßt, die vielleicht mit flüssigem Inhalt angefüllt sind, also Vakuolen darstellen. Er hat keine Querwände gefunden, so daß das ganze Pflänzchen eine einzige Zelle vorstellt. Der Plasmazerfall führt später zu einer Zerbröckelung der Fäden, die Lachner-Sandoval, im Gegensatz zur Segmentation oder Sporenbildung, als Fragmentation bezeichnet.

Neukirch[2]) beobachtete keine Vakuolen; er unterscheidet in den Fäden eine Membran, das Außen- und Innenplasma; im Plasma findet er lichtbrechende Körner, die er als Zellkerne auffaßt. Dem Terminus Fragmentation gibt er einen anderen Sinn, als Lachner-Sandoval; unter dieser Bezeichnung beschreibt er die Bildung der Luftsporen, die er Fragmentationssporen nennt. Die Fragmentation tritt in den Fäden der Quere nach ein, so daß die Fragmentationssporen durch Lücken voneinander getrennt sind. Die Hyphen zerfallen in Sporen, zwischen denen er kleine, schwach lichtbrechende Fadenstückchen beobachtete. Er bezeichnet die Fragmentationssporen nach ihrem Bildungscharakter; da sie nun aber spezielle, der Verbreitung durch die Luft dienende Gebilde sind, so erscheint es viel zweckmäßiger, ihnen einen ihre Funktion bezeichnenden Namen zu geben, wie z. B. Luftsporen oder Luftkonidien.

Nach Neukirch teilt sich infolge der Quermembranbildung auch das Mycel des Bodensatzes der Bouillonkulturen in Glieder, welche er Oidiumsporen nennt. Diese Gebilde, die wahrscheinlich mit den Lachner-Sandovalschen Fragmentationsgebilden identisch sind, besitzen keine besondere thermische Resistenz. Neukirch betrachtet sie als Gebilde, die die Hungerperiode in untergetauchtem Zustande überdauern.

Die Luftsporen vertragen eine etwas höhere Temperatur als das Luftmycel, etwa 75—85°, statt nur 60—65°, wie das Mycel.

Es gibt keine Endosporen bei den Aktinomyceten. Dieselben sind nur von Olsen[1]) und später von Peklo[2]) beschrieben worden. Diese Forscher haben aber nicht gezeigt, daß diese Gebilde eine thermische Resistenz besitzen. Der von Peklo beschriebene Organismus kann gar nicht den Aktinomyceten zugezählt werden. Er bildet nicht nur Endosporen, sondern auch besondere Bläschen oder Kolben in alkalischen Bierwürze-Calciumtartrat-Lösungen, die der Forscher für Sporangien und für identisch mit den Kolben, welche diese Organismen im Tierkörper bilden, ansieht. Der Organismus ist aber gar nicht imstande, ein Luftmycel zu bilden. Kleine knollenförmige Anschwellungen sind allerdings bei den Aktinomyceten in künstlichen Nährböden gefunden worden. Solche Gebilde habe auch ich bei einer Art gefunden, aber das waren durchaus typische Aktinomyceten, die gut Luftmycel bildeten.

Man hat viele verschiedene Aktinomyceten in der Natur gefunden, von denen viele gar keine Pathogenität zeigen. Im Jahre 1888 hat Macé[3]) unter dem Namen Cladothrix dichotoma einen Actinomyces beschrieben, der ein braunes Pigment auf Gelatine und Agar bildet.

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 3. 1897. p. 273.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 27. 1910. p. 451.

[3]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. T. 106. 1888. p. 1622.

Gasperini[1]) hat einen Actinomyces, den er mit dem Streptothrix Foersteri Cohn identifizierte, in der Luft gefunden. Später hat dieser Forscher[2]) verschiedene Aktinomyceten beschrieben, von denen einige pigmentiert waren und einer, Actinomyces chromogenes, auch braunes Pigment absonderte. Auch Rossi-Doria[3]) hat eine Reihe von gefärbten Arten gefunden und unter ihnen auch die Chromogenes-Art Streptothrix nigra. Savageau und Radais[4]) haben auch unter dem Namen Oospora Metschnikowii eine Pigment abscheidende Art isoliert.

Im Jahre 1888 hat Globig[5]) einen thermophilen Actinomyces beschrieben, der bei 58° auf mit Gartenerde infizierten Kartoffeln erschien. Thermophile Aktinomyceten haben Kedzior[6]) aus Erde, und Sames[7]) aus Milch isoliert, desgleichen haben Berestneff[8]) und Tsiklinsky[9]) solche Arten beschrieben. Später hat Miehe[10]) den Actinomyces thermophilus aus selbsterhitztem Heu isoliert.

Die Isolierung der pathogenen Aktinomyceten gelang den medizinischen Bakteriologen nicht immer leicht; sie ging aber besser, wenn man die Isolierung der Aktinomyceten unter anaëroben Bedingungen vornahm. Wolf und Israel[11]) haben einen anaëroben Actinomyces gefunden, desgleichen haben Aschoff[12]), Levy[12]) und Mertens[13]) später solche Arten gefunden. Nach Bruns[14]) gibt es Übergangsformen zwischen den aëroben und anaëroben Aktinomyceten. Sames hat seinen thermophilen Actinomyces unter aëroben und anaëroben Bedingungen kultiviert und ist zu dem Schlusse gelangt, daß das anaërobe Wachstum des Actinomyces bei hohen Temperaturen schlechter von statten geht, als das aërobe, während er bei niedriger Temperatur unter anaëroben Bedingungen besser wächst, als unter aëroben.

Die Frage der Anaërobiose bei den Aktinomyceten kann bisher noch nicht, als gelöst betrachtet werden. Aus der Möglichkeit für einen Organismus, unter anaëroben Bedingungen zu leben, sowie aus der Leichtigkeit der Isolierung, darf durchaus nicht geschlossen werden, daß man es mit einem anaëroben Organismus zu tun hat, insbesondere, wenn es sich um eine Organismengruppe handelt, die besondere Luftorgane besitzt.

Man hat, wie bereits erwähnt, viele Aktinomycetenarten in der Luft, im Boden und im Wasser gefunden, ohne zu wissen, was für eine Rolle sie in der Natur spielen. Es war schon lange bekannt, daß die Aktinomykoseinfektion durch Gramineenstroh und -ähren hervorgerufen wird. Bang[15]),

---

[1]) Ann. de micrographie. 1890. p. 449.

[2]) Ann. d'Ig. spoz. II. Nach Lehmann u. Neumann.

[3]) Ann. dell'Inst. d'Ig. Spez. d. R. (Univ. di Roma. 1892. Nach Lehmann u. Neumann.

[4]) Ann. de l'Inst. Past. T. 6.

[5]) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 3. 1888. p. 294.

[6]) Arch. f. Hyg. Bd. 27. 1897.

[7]) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 33. 1900. p. 313.

[8]) [Diss.] Moskau 1897.

[9]) Ann. de l'Inst. Past. T. 17. 1903. p. 217.

[10]) Die Selbsterhitzung des Heus. Jena 1907.

[11]) Virchows Archiv. Bd. 126. 1891. p. 11.

[12]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 26. p. 1.

[13]) Zeitschr. f. Hyg. Bd. 42. p. 45.

[14]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 26. p. 11.

[15]) Deutsch. Zeitschr. f. Tiermed. Bd. 10. 1884; nach Lafar zitiert.

Korsak[1]) und später **Berestneff** haben Aktinomyceten auf Getreidestroh und -ähren gefunden. Der letztgenannte Forscher hat Strohstöckchen in nassen Sand gesteckt und konstatiert, daß sich unter solchen Bedingungen die Aktinomyceten gut entwickeln.

Man stellte die Frage der Verbreitung der Aktinomyceten nur mit Hinsicht auf die Pathogenität, ohne ihre physiologischen Eigenschaften zu berücksichtigen. Zuerst finden wir bei **Gasperini**[2]) einige Bemerkungen über die Reaktion des Nährbodens, der unter dem Einfluß der Lebenstätigkeit der Organismen alkalisch wird, sowie über die Stickstoffernährung und Invertasebildung desselben.

Die ersten Untersuchungen über die Bedeutung der Aktinomyceten in der Natur hat **Rullmann**[3]) ausgeführt. Nach diesen Untersuchungen ist der Actinomyces odorifer der Erreger des Bodengeruchs, den er auf Kohlenhydrate enthaltenden Nährmedien bildet; er besitzt aber keine nitrifizierenden Eigenschaften, wie dieser Forscher früher geglaubt, später aber selbst widerlegt hat.

Beijerinck[4]) studierte die Verbreitung der Aktinomyceten in der Natur, sowie ihre physiologischen Eigenschaften. Er hat die Aktinomyceten in Gartenerde bis zu 1 m Tiefe, in Dünensand bis zu 2 m Tiefe und im Schlamm der Maas unter dem Flußbette gefunden. Auf der Wurzelrinde einer Reihe von Pflanzen — Kräutern und Bäumen — saßen Aktinomyceten fest. Die Aktinomyceten sind omnivor und erhalten und vermehren sich sowohl unter üppigen, als auch außerordentlich ungünstigen Ernährungsbedingungen. Sie besitzen die Eigenschaft, die Nitrate zu Nitriten zu reduzieren und bilden Diastase.

Actinomyces chromogenes, der auf Peptonnährböden ein braunes Pigment abscheidet, bildet unter solchen Bedingungen Chinon, das als ein oxydierendes Agens fungieren kann, was von großer Bedeutung für die Humusbildung und Zersetzung ist.

Macé[5]) hat gefunden, daß seine Cladothrix chromogenes auf Blutserum Ammoniak und Propepton bildet und Tyrosinkristalle abscheidet.

Sames[6]), der den thermophilen Actinomyces aus Milch isolierte, studierte die Diastasebildung und hat gefunden, daß in Bouillon mit Stärke die Diastasewirkung bis zur Erythroreaktion geht, aber er konnte keinen reduzierenden Zucker finden.

Caminiti[7]) hat bei seinen Aktinomyceten Invertase und Diastase, aber kein Emulsin und keine Koagulase gefunden.

Hiltner und **Störmer**[8]) haben im Jahre 1903 Untersuchungen über die Zahl der Bakterien im Boden angestellt. Im Frühjahr wurden 20 %, im Herbst 30 Proz. Aktinomyceten unter der Gesamtmenge der Bakterien gefunden.

---

[1]) Arch. f. Veterinärwiss. 1896. [Russ.]

[2]) Ann. de microgr. Paris 1890.

[3]) [Diss.] München 1895; Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. 17; Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 2. 1896. p. 116 u. 701; Bd. 5, 1899. p. 212, 713.

[4]) l. c.

[5]) Compt. rend. de l'Acad. des Sc. T. 141. p. 147.

[6]) l. c.

[7]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. p. 198.

[8]) Arb. a. d. biol. Abt. d. kais. Gesundh.-Amt 1903. H. 3.

Fischer[1]) hat in Lehmboden, lehmigem Sand und Sandboden wenige Aktinomyceten gefunden.

Fousek[2]) hat gefunden, daß im Boden hauptsächlich 2 Streptothrix-Arten: chromogena und alba vorkommen. Ebenso wie Hiltner und Störmer hat Fousek im Herbst einen höheren Prozentsatz von Aktinomyceten gefunden als im Frühjahr. Er fand Aktinomyceten in Waldboden und auf Wurzeln verschiedener Pflanzen, z. B. auch auf Gramineen- und Papilionaceenwurzeln, deren obere Zellschichten abgestorben waren.

Das Temperaturoptimum der von Fousek isolierten Arten liegt zwischen 18—23° C; sie assimilieren gut Nitrat-, Ammon- und Amidstickstoff und spalten Ammoniak aus organischen, stickstoffhaltigen Stoffen ab. Nitrat wird zu Nitrit reduziert, freier Stickstoff nicht assimiliert. Von den Kohlenstoffverbindungen sind Trauben- und Milchzucker gute, Stärke und Zellulose weniger gute Quellen. Den Aktinomyceten kommt eine deutliche Beeinflussung des Wachstums der Pflanzen zu.

Münter[3]) hat 7 Aktinomycetenarten isoliert und studiert. Sie assimilierten gut Zucker und organische Salze. Die organischen Stoffe haben einen großen Einfluß auf die Pigmentbildung, was auch ich bei meinen Aktinomyceten beobachtete. Die Aktinomyceten sind nach Münter sehr empfindlich gegen Säuren und Alkalien.

Kapitel 2.

Anhäufungs- und Separationsmethoden.

Die Kenntnis der Beziehungen eines Organismus zu anderen Lebewesen und zur anorganischen Natur ist die Aufgabe der Ökologie, die die Bedingungen des Sieges im Kampfe ums Dasein untersucht. Das ökologische Studium eines höheren Organismus besteht vorzugsweise in der Aufzeichnung der Bedingungen, unter denen der Organismus sich in der Natur entwickelt.

Es ist aber sehr schwer, die in der Natur vorhandenen Bedingungen für die niederen Organismen zu registrieren, da sie sehr kompliziert sind. Für die Mikrobiologie ist es also unmöglich, die gewöhnlichen Methoden der Ökologie anzuwenden; daher hat sie einen anderen Weg zu gehen. Sie benutzt zu diesem Zwecke das experimentelle Anhäufungsverfahren. Unter Anhäufungsmethoden versteht man bekanntlich Verfahren, mit deren Hilfe man experimentell solche Bedingungen schafft, die dem den Gegenstand der Untersuchung bildenden Organismus im Kampfe ums Dasein zu siegen gestatten. Außerdem gestattet diese Methode, bestimmte Mikrobenarten zu erhalten, und wird von den Bakteriologen in der Regel zu diesem Zwecke benutzt.

Schon Pasteur hat diese Methode angewandt; in seinen Gärungsversuchen hat er mit den erhaltenen gärenden Flüssigkeiten zur Zeit ihrer lebhaftesten Gärung neue sterile Flüssigkeiten infiziert. Als Elektionsverfahren wurde diese Methode von Winogradsky bei seinen Studien über Nitrifikation und Stickstoffassimilation benutzt. Nach Winogradsky

---

[1]) Landw. Jahrb. 1909.

[2]) Mitt. d. landw. Lehrkanzel d. K. K. Hochsch. f. Bodenkult. Wien. 1912. p. 217—244.

[3]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36. 1913. p. 365.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

ist eine Kultur als eine elektive zu bezeichnen, wenn sie die Aufdeckung nur einer bestimmten Funktion, die möglichst begrenzt ist, fördert. In einer solchen Kultur ist das Wachstum anderer Mikroben nicht oder nur schwer möglich. Wir helfen also dem gesuchten Mikroorganismus in seiner Lebenskonkurrenz mit anderen Mikroorganismen, weshalb er sich anhäuft.

Beijerinck mißt den Anhäufungsmethoden eine besonders große Bedeutung bei. Sie bezwecken, seiner Meinung nach, aus einem Gemenge von Mikroben diejenigen Arten und Varietäten, welche an gewisse, vorausbestimmte Lebensbedingungen adaptiert sind, in flüssigen Kulturmedien zu einseitiger Entwicklung zu bringen. Die Anhäufung führt nicht zu einer reinen Linie, sondern zu Populationen, so daß wir die Arten nicht nur in ihren einzelnen Varietäten, sondern auch in bezug auf ihre Variationsrichtung kennen lernen. Die Anhäufung soll also nicht nur als ein Mittel, bestimmte Mikroben zu erhalten, dienen, sondern, in Verbindung mit anderen Eigenschaften, auch als charakteristisches diagnostisches Merkmal einer jeden Mikrobenart gelten.

Für die Aktinomyceten sind noch keine Anhäufungsmethoden angegeben worden. Da man aber sehr viele Aktinomyceten in organischen Pflanzenresten findet, so kann man annehmen, daß sie sich in organischen Lösungen anhäufen können. Doch haben mir meine Versuche gezeigt, daß die gut assimilierbaren, löslichen, organischen Stoffe, wie z. B. Zucker, Asparagin, Ca-Malat usw. zu diesem Zwecke gar nicht geeignet sind, da auf solchen Nährlösungen die Bakterien das Aktinomycetenwachstum unterdrücken. Als viel besser erwies sich Stärke, da in einer Stärke enthaltenden Nährlösung bei hoher Temperatur die Aktinomyceten schon am 2. Tage auftreten. Ich habe bei meinen Versuchen eine Nährlösung von folgender Zusammensetzung verwendet:

Leitungswasser . . .	50 ccm
Stärke	1 %
NH_4Cl	0,05 %
K_2HPO_4	0,05 %.

Wird solch eine Nährlösung im Erlenmeyerkolben stark mit Gartenerde infiziert, so erhalten wir bei 40° am 2. Tage infolge der starken Vermehrung der Bakterien eine schwarze Färbung und H_2S-Geruch, und auf der Oberfläche der Lösung sehen wir einige schwimmende Aktinomycetenkolonien. Bei der Überimpfung in eine neue Lösung von gleicher Zusammensetzung erhalten wir sehr kräftiges Wachstum der sporenbildenden Bakterien, die eine kräftige Haut bilden, aber kein Wachstum der Aktinomyceten.

Bei 45° finden wir bei der Verwendung einer solchen Nährlösung schon im ersten, mit Erde geimpften Kolben eine große Menge von sporenbildenden Bakterien, die eine Haut bilden. Bei den Überimpfungen in frische Nährlösungen von der gleichen Zusammensetzung finden wir, daß sich die Aktinomyceten mehr, die Bakterien aber weniger kräftig entwickelt haben, so daß es nun sehr leicht ist, auf Ca-Malatagar von der 3. oder 4. Überimpfung eine reine Aktinomycetenkultur des Actinomyces diastaticus zu erhalten.

Da ich bei 40° keine Anhäufung, wohl aber im ersten Kolben ein Wachstum der Aktinomyceten gesehen habe, so schien es, daß die Ursache des stärkeren Wachstums der Bakterien von der Stickstoffquelle abhing. Neue Versuche mit KNO_3, anstatt NH_4Cl, zeigten, daß die Anhäufung gut vonstatten geht, wenn wir mehr KNO_3 nehmen, z. B. in einer Nährlösung von folgender Zusammensetzung:

Leitungswasser . . .	50 ccm
Stärke	1 %
KNO_3	0,3 %
K_2HPO_4	0,05 %.

Bei 40° bemerkten wir am 2. Tage breite, an der Oberfläche schwimmende Aktinomycetenkolonien; unter dem Mikroskop sahen wir stark entwickelte Aktinomycetenfäden, die die schwimmenden Stärkekörner umfassen. Hier und da bemerkten wir große, bewegliche Stäbchen mit Sporen am Ende. Bei der Überimpfung vermindert sich die Bakterienmenge, und die Aktinomyceten häufen sich an. Dieses Verfahren führte zur Auffindung von Actinomyces coelicolor und Act. diastaticus. Bei 35° ist diese Nährlösung aber nicht mehr tauglich.

Einen anderen Weg zur Anhäufung der Aktinomyceten habe ich in folgendem, Zellulose als C-Quelle enthaltendem Nährboden gefunden:

Leitungswasser . . .	50 ccm
Zellulose	2—3 %
NH_4Cl	0,05 %
K_2HPO_4	0,05 %.

Bei 45° habe ich keine Entwicklung von Aktinomyceten beobachtet, aber bei 40° sehen wir 2 Tage nach der Infizierung mit Gartenerde eine reichliche Aktinomycetenflora und Sporen bildende Bakterien. Die dritte Überimpfung kann als praktisch reine Kultur des Actinomyces cellulosae dienen, den ich nur auf diese Weise gefunden habe.

Bei Verwendung von Polysacchariden bei hohen Temperaturen erhalten wir Aktinomycetenanhäufung. Die erhaltenen Arten sind nicht thermophil, und ihr optimales Wachstum liegt bei 30—35°. Sie sind aber nur bei hohen Temperaturen imstande, die anderen Mikroben zu besiegen.

Daß die Zellulose ein gutes Nährmaterial für die Aktinomyceten abgibt, konnte man schon aus ihrer großen Verbreitung auf Stroh, Heu, Wurzeln usw. schließen; bei niedriger Temperatur werden jedoch keine Aktinomycetenanhäufungen erhalten. Daß aber die Polysacchariden auch für natürliche Anhäufungen in Pflanzenresten bei hohen Temperaturen ein gutes Material abgeben, zeigen die Untersuchungen von Miehe über das sich selbst erhitzende Heu, in dem sich der Actinomyces thermophiles anhäufte.

Die Degenerationsmethoden waren die einzigen, die man bis jetzt für die Untersuchung der Verbreitung der Aktinomyceten in der Natur benutzt hat. Nicht nur zur Isolierung, sondern auch zum Zählen hat man den gewöhnlichen bakteriologischen Nährboden, die Bouillongelatine, verwendet. Auf diesen Platten entwickelt sich eine gewaltige Menge von verflüssigenden Bakterien und Aktinomyceten, die die Gelatine verflüssigen, bevor alle Aktinomyceten sich entwickelt haben. Außerdem liegt die Temperatur der Gelatineverflüssigung niedriger als das Temperaturoptimum des Aktinomycetenwachstums. Es ist viel besser, zu diesem Zwecke Agarnährböden mit 1 bis 2 Proz. einer C-Quelle, die das Wachstum der Aktinomyceten fördert, zu benutzen.

Schon nach 24 Stunden ist bei 37° ein Wachstum der Aktinomyceten zu bemerken, und nach 48 Stunden sind sie so gut entwickelt, daß viele mit einem Luftmycel bedeckt sind. Auf solchen Stärkeplatten kann man die Diastase bildenden von den keine Diastase bildenden Arten unterscheiden; die ersteren bilden ein rundes Diffusionsfeld, wo die Stärkekörner gelöst sind, mit der Aktinomycetenkolonie im Zentrum. Doch ist die Stärkeplatte etwas unbequem, da sich hier und da Bakterienhäute bilden.

Auf dieser Platte bilden die Bakterien keine ausgebreiteten Häute, so daß alle Aktinomycetenkolonien ganz frei sitzen. Anstatt Ca-Malat kann man auch Ca-Tartrat verwenden, doch sind auf solchem Nährboden die Bakterienhäute etwas mehr ausgebreitet.

Am 17. April habe ich auf Ca-Malatagar nach 2 Tagen 3700, nach 4 Tagen 8200 und nach 16 Tagen 14 900 Aktinomycetenkolonien in 1 g Gartenerde gefunden. Einen Monat später war die Aktinomycetenzahl etwas höher — 20 800 Kolonien in 1 g Erde. Das sind ungefähr 30 Proz. der Gesamtzahl der auf Ca-Malatagar gewachsenen Mikroben.

Ein Versuch, zur Bestimmung der Aktinomycetenzahl in verschiedener Tiefe des Bodens, den ich am 24. Juni im Laboratoriumsgarten gemacht habe, zeigte, daß schon eine 75 cm tiefe Schicht sehr arm an Aktinomyceten ist, was vielleicht dem Wasserreichtum der unteren Schichten zuzuschreiben ist. Dieser Versuch zeigte auch, daß die obere Schicht viel ärmer an schnell wachsenden Formen ist als die 50 cm tiefe. Die später erscheinenden Aktinomyceten unterscheiden sich nach der Größe und Farbe der Kolonien von den früher erscheinenden und gehören zu einer besonderen Aktinomycetengruppe, die ich als Mikrogruppe bezeichne. Diese Untersuchung zeigte also, daß die Aktinomyceten der Mikrogruppe viel mehr in den oberen Schichten verbreitet sind als in den unteren.

Im an organischen Resten armen Sandboden aus dem Haagschen Wald habe ich nur wenig Aktinomyceten gefunden, eine sehr große Menge jedoch in Buchenlaub, wo besonders die Art griteus dominierte. Das Buchenlaub gibt den sehr starken, für die Aktinomyceten so charakteristischen Geruch von sich, den man als Erdgeruch bezeichnet.

Im Dünensand mit verwelkten Psammapflanzen habe ich ein wenig mehr Aktinomyceten gezählt, als im Waldsand. Die meisten Dünensand bewohnenden Aktinomyceten gehörten zu der Mikrogruppe.

Die Untersuchungen über die Verbreitung der Aktinomyceten in der Natur zeigen, daß ihnen eine wichtige Rolle zukommt. Wir wissen schon aus den Untersuchungen von Kopsak und Berestneff, daß man auf der Oberfläche von trockenen Nährpflanzen, besonders von Stroh, Heu, Getreideähren usw. stets Aktinomyceten findet. Beijerinck hat sie auf den Wurzeloberflächen, Miehe in sich selbst erhitzendem Heu angehäuft gefunden.

Alle diese Befunde führen mit Notwendigkeit zu dem Schlusse, daß die Aktinomyceten einen sehr großen Anteil an der Zersetzung und Humifizierung der Pflanzenreste nehmen.

3. Kapitel.

Morphologie.

Von den Bakterien unterscheidet sich die Familie der Aktinomyceten durch die Verzweigung des Mycels. Der Hauptunterschied der Gattung „Actinomyces“ von den anderen dieser ganzen Familie liegt in der in seinen Kolonien auftretenden Differenzierung, und zwar ist das Mycel der Kolonie zum Teil in den Nährboden getaucht, zum Teil ein Luftmycel. Das letztere bildet Luftsporen (Konidien, Arthrosporen), die zur Verbreitung durch Luftströmungen dienen. Diese typische Differenzierung und die charakteristische Färbung des Luftmycels und der ganzen Kolonie, die für die Unterscheidung der Arten von großer Wichtigkeit ist, erhalten wir aber nur unter günstigen Wachstumsbedingungen, bei vollem Luftzutritt und geeignetem Nährboden.

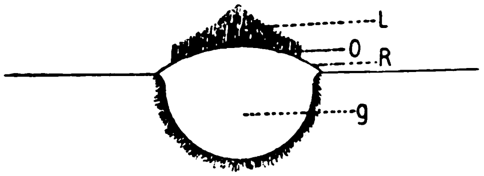


Fig. 1.

Agarkolonien. Eine einkeimige Aktinomyces-Kolonie ist immer rund; sie wächst in den Nährboden hinein und bildet unter der Agaroberfläche eine Halbkugel (Fig. 1 g), die man gut sieht, wenn eine solche Kolonie am Rande einer Petri-Schale gewachsen ist. Diese Halbkugel wird von einer gallertartigen Masse gebildet, die aus einem dichtem Geflecht von Hyphen besteht. Die Hyphen wachsen weiter in den Agar ein, und man bemerkt bei Anwendung einer schwachen Vergrößerung, daß die untergetauchte Halbkugel gleichsam von einem Filz von verästelten Fäden umfaßt ist. Bei jungen Kolonien wird dieser Filz größer, als bei den alten, was sich durch schnelleres Wachstum der Kolonie im Jugendstadium erklären läßt.

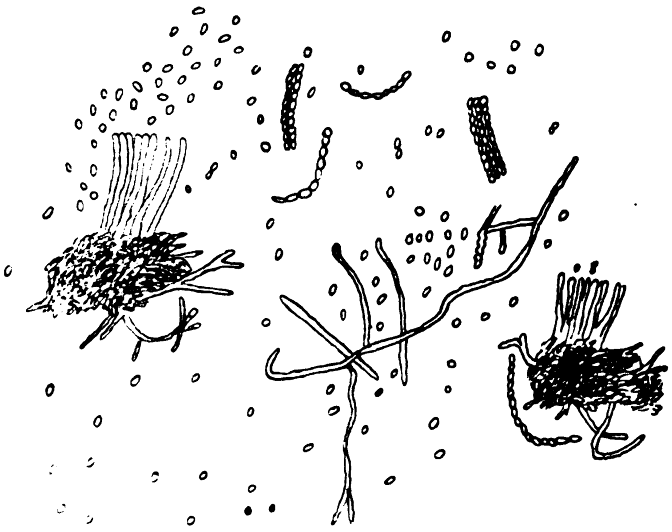


Fig. 2.

Die Luftoberfläche ist wie ein umgekehrtes Uhrglas gewölbt und bedeckt sich unter bestimmten Bedingungen mit einem Luftmycel, das sich als kleiner Konus emporwölbt, den man mit schwacher Vergrößerung gut beobachten kann. Das Luftmycel bedeckt gewöhnlich einen mehr oder weniger großen Teil der zentralen Luftoberfläche der Kolonie. Es bleibt also ein Rand übrig, der frei vom Luftmycel ist (Fig. 1, O, L u. R.).

Die Lufthyphen schnüren Luftsporen ab, die sich sehr leicht von den Mutterhyphen losmachen oder vielleicht frei auf der Luftmyceloberfläche liegen. Ein ganz schwacher Luftstrom genügt, um die Luftsporen fortzutragen. Die Lufthyphen ragen an der Luftoberfläche der Kolonien als dicht aneinanderliegende Fäden (Fig. 2) empor. Die Luftsporen schwimmen in einem Wassertropfenpräparat frei, einzeln, paarweise oder zu einer Kette vereinigt. Manchmal beobachtete ich, daß das Ende einer Lufthyphe drei bis vier Einschnürungen trägt. Aus einer solchen Lufthyphe wird später eine Kette von Luftsporen gebildet, die nun kein merkliches Wachstum mehr zeigen.

Die Form der Luftsporen der Mikrogruppe ist genau kugelig (Fig. 3), die der Makrogruppe oval oder kugelig. Die Größe der Luftsporen der verschiedenen Arten schwankt zwischen 0,7 und 2 μ. Sie ist für jede Art etwas variabel, aber diese Verschiedenheit ist bei einigen Arten nicht deutlich, bei den anderen hingegen sehr deutlich ausgeprägt. Im allgemeinen ist die Größe der kugeligen Luftsporen der Mikrogruppe viel weniger variabel, als die der ovalen Luftsporen der anderen Gruppen.

Bei den ersteren geht das Abschnüren der Luftsporen so schnell vor sich, daß man gewöhnlich im Präparat keine Hyphen, sondern nur die frei oder als Zooglöen zusammenliegenden kokkenähnlichen Luftsporen findet.

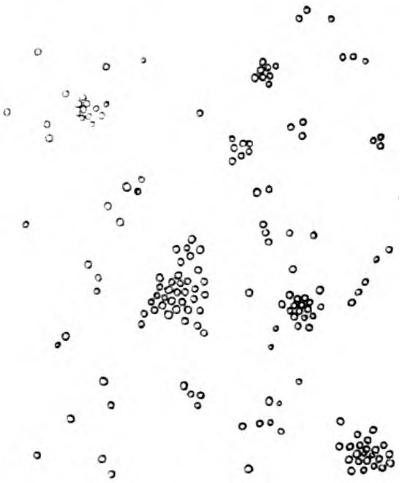


Fig. 3.

Ein ganz besonderes Bild zeigte die Art microflavus, die kein Luftmycel auf Ca-Malatagar, wohl aber solches auf Glukoseagar bildet. Die Lufthyphen dieser Art zerfallen in große bazillen- oder kokkenähnliche Gebilde, die oft paarweise oder in Ketten vereinigt sind. Neben diesen habe ich Fädchen beobachtet, deren Enden kolbenähnlich aufgeblasen waren (Fig. 4). Die Luftsporen sind bei dieser Art 2 μ dick, ihre Länge beträgt 2—5 μ. Sie sind dicker als die Hyphen, so daß die Bläschen sich vielleicht später als Luftsporen abschnüren. Bei anderen Spezies habe ich eine solche Erscheinung nicht beobachtet.

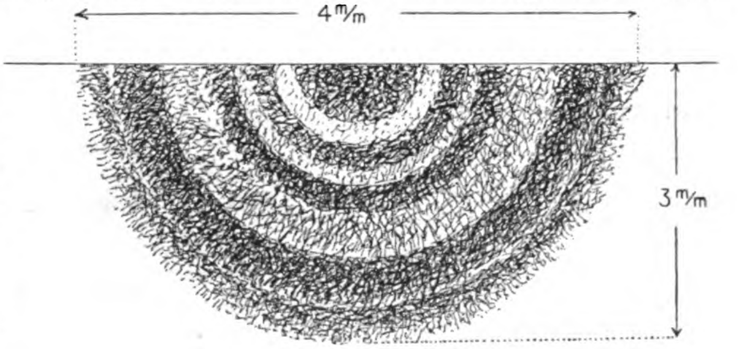


Fig. 4.

Das Luftmycel ist bei den meisten Aktinomyceten gefärbt. Die Farbe desselben ist ein ganz konstantes Merkmal für jede Actinomyces-Art, aber sie erscheint nur unter bestimmten Bedingungen; sie verändert sich z. B. in Weiß, wenn man einen Nährboden benutzt; der zu reich an Stickstoff ist. Bei noch größerem Stickstoffgehalt des Nährbodens, z. B. auf gewöhnlichem Bouillon- oder Peptonagar, bilden die meisten Aktinomyceten gar keine Luftmycel, oder nur einen kreidepulverähnlichen Belag. Es gibt aber Arten, die auch auf solchen stickstoffreichen Böden ein weißes Luftmycel bilden.

Das Luftmycel ist manchmal zweifarbig. Es besteht entweder eine Ver-

Tabelle 1. Einfluß des Nährbodens (Agar-Platten) auf

<table>
<tr><th>C-Quelle</th><th rowspan="2"></th><th colspan="5">1 % Stärke</th></tr>
<tr><th>0,05 % N-Quelle</th><th>KNO_2</th><th>KNO_2</th><th>NH_4Cl</th><th>Asparagin</th><th>Pepton</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. erythrochromogenes</td><td>L.-M.</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. griseus</td><td>L.-M.</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. diastaticus</td><td>L.-M.</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. cellulosae</td><td>L.-M.</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. roseus</td><td>L.-M.</td><td>weiß und rosa</td><td>weiß und rosa</td><td>rosa</td><td>rosa</td><td>weiß und rosa</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. albus</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>grau</td><td>grau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. diastatochromogenes</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>hellgrau</td><td>hellgrau</td><td>hellgrau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">ungefärbt</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. griseoflavus</td><td>L.-M.</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td><td>grüngrau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">gelb</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. citreus</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">gelb</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. viridochromogenes</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td>grün</td><td>grün</td><td>grün</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. flavochromegenes</td><td>L.-M.</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td><td>hellgrau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">gelb</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. flavus</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>grau</td><td>grau</td><td>grau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">gelb</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. parvus</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weißrosa</td><td>weiß</td><td>grau</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">gelb</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. microflavus</td><td>L.-M.</td><td>—</td><td>weiß</td><td>weißrosa</td><td>weiß</td><td>weiß</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td colspan="5">gelb</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. ruber</td><td>L.-M.</td><td>dunkelrot</td><td>dunkelrot</td><td>kein L.-M.</td><td>dunkelrot</td><td>kein L.-M.</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. melanocyclus</td><td>L.-M.</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. melanosporeus</td><td>L.-M.</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td><td>schwarz</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Act. albosporeus</td><td>L.-M.</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td><td>weiß</td></tr>
<tr><td>Kol.</td><td>—</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td><td>rot</td></tr>
</table>

die Farbe des Luftmycels und der Kolonien.

1 % Glukose				1 % Ca-Malat	1 % Ca-Nitrat	1 % Pepton	Je 1 % Ca-Malat und Glukose	Kartoffel
KNO_3	NH_4Cl	Asparagin	Pepton	NH_4Cl	NH_4Cl		NH_4Cl	
weiß	weiß	grau	grau	grau ungefärbt	weiß	weiß	grau	grau
grüngrau	grüngrau	grüngrau	grüngrau	grüngrau ungefärbt	dunkel grau	weiß	grüngrau	weiß
grau	grau	grau	grau	grau ungefärbt	grau	grau	grau	grau
grau	grau	grau	grau	— ungefärbt	grau	weiß	grau und weiß	grau
weiß	rosa	weiß und rosa	weiß und rosa	rosa ungefärbt	rosa	weiß und rosa	weiß und rosa	weiß
weiß	weiß	grau	grau	weiß ungefärbt	hellgrau	kein L.-M.	weiß	weiß
weiß	weiß	grau	—	dunkelgrau ungefärbt	dunkelgrau	kein L.-M.	grau	grau
grüngrau	grüngrau	weiß	weiß	grüngrau gelb	dunkelgrau	weiß	weiß	weiß
weiß	weiß	weiß	weiß	weiß gelb	—	weiß	weiß	weiß
weiß grün	weiß grün	weiß grün	weiß schwarz	weiß grün	— —	weiß kein L.-M.	weiß schwarz	— —
hellgrau	weiß	grau	weiß und grau	grau gelb	grau	kein L.-M.	hellgrau	weiß
weiß und grau	weiß und grau	grau	weiß	weiß und grau gelb	grau	kein L.-M.	weiß und grau	weiß
hellgrau	weiß	weiß	weiß	grau gelb	weiß	kein L.-M.	hellgrau	weiß
weiß-rosa	kein L.-M.	weiß	weiß	kein L.-M. gelb	weiß	kein L.-M.	weiß	kein L.-M.
kein L.-M. rot	kein L.-M. rot	dunkelrot rot	kein L.-M. rot	dunkelrot rot	— —	kein L.-M. rot	dunkelrot rot	— —
schwarz rot	schwarz rot	schwarz rot	schwarz rot	schwarz rot	— —	kein L.-M. rot	— —	Kein Wachstum
schwarz rot	schwarz rot	schwarz rot	schwarz rot	schwarz rot	— —	kein L.-M. rot	— —	— —
weiß rot	weiß rot	weiß rot	weiß rot	weiß rot	— —	kein L.-M. rot	— —	— —

schiedenheit im Farbenton oder die peripherischen Teile des Luftmycels sind weiß. In einigen Fällen ist die Farbe in der ersten Entwicklungsperiode weiß, und erst später erhält das Luftmycel die charakteristische Färbung. Ein solches Beispiel liefert Act. flavus, der ein weißes Luftmycel bildet, das sich später grau färbt, so daß es also Kolonien gibt, die ein zweifarbiges Luftmycel haben. Dasselbe bemerken wir bei Act. roseus auf Glukose-Pepton-Agar, wo sein Luftmycel weiß und rosa gefärbt ist.

Die Tabelle 1 zeigt an einigen Beispielen, wie sich die Farbe des Luftmycels auf verschiedenen Nährböden verändert, die Tabelle 2 die Veränderung derselben in Abhängigkeit von der Stickstoffquantität des Nährbodens.

In einer Arbeit über die Aktinomyceten hat Minkmann gezeigt, daß sich unter dem Einfluß der verschiedenen C-Ernährung die Farbe der Aktinomyceten verändert. Meine Versuche bestätigen also diese Erscheinung.

In den meisten Fällen verändert sich nur der Farbenton, nur selten die Farbe selbst. Ca-Chinat gibt z. B. eine sehr dunkle Färbung der Art griseus und griseoflavus, und nur die Arten albus und diastatachromogenes zeigen eine starke Veränderung der Farbe auf diesem Nährboden.

Eine Reihe von Aktinomyceten hat ungefärbte Kolonien, die einen durchsichtigen, weißgrauen Farbenton haben; die anderen sind gelb, rot, grün, schwarz oder blau gefärbt. In einigen Fällen tritt die Farbe nicht in der ersten Entwicklungsperiode, sondern etwas später auf.

Ebenso wie die Farbe des Luftmycels variiert in Abhängigkeit von den Ernährungsbedingungen auch die Färbung der ganzen Kolonie, sowie die Pigmentierung, worauf ich noch weiter unten zurückkommen werde.

Wie die Tabelle 2 zeigt, hält schon 0,1 Proz. Asparagin die Luftmycelbildung zurück und gibt nicht die typische Farbe; bei 0,5 Proz. Asparagin ist nur das Luftmycel des Act. diastaticus schwach grau und das des Act. roseus schwach rosa gefärbt. Alle anderen Arten verlieren die charakteristische Farbe. Ebenso wirkt Pepton. Mit KNO_3 gelingt der Versuch nicht so gut, da KNO_3 auch in schwachen Konzentrationen entfärbend wirkt.

Seltener bemerken wir einige andere Bilder: So gibt es einige Arten, bei welchen das Luftmycel auf den Rändern der Kolonien erscheint, so daß wir einen Ring erhalten. Ein solches Luftmycel haben die Formen, die es spät bilden, z. B. Act. flavochromogenes oder parvus. Act. microflavus auf einer Stärkeplatte mit 0,1 Proz. KNO_3 als Stickstoffquelle bildete konisch erhöhte Kolonien; das Luftmycel bedeckte die peripherischen Teile der Kolonien, so daß sich eine kraterähnliche Einsenkung bildete.

Die Strichkolonien auf Agarnährboden bilden sich aus einer großen Keimmenge, so daß die einzelnen Kolonien einander zusammendrücken. Die Oberfläche ist flach oder faltig und ganz oder teilweise mit Luftmycel bedeckt.

Gelatinekolonien. Die Aktinomyceten wachsen auf Bouillongelatine und die meisten auf reiner Gelatine. Die einkeimigen Kolonien sind rund und derb. Sie besitzen einen Filz von verästelten Fäden, der die untere Schicht der Kolonie umfaßt. Die Kolonien sind flach und zeigen oft konzentrische Struktur an ihrer Oberfläche. Die meisten verflüssigen die Gelatine. Nur Act. citreus bildet auf Bouillongelatine ein Luftmycel.

Kolonien in flüssigen Nährboden. In flüssigen Nährböden bilden die Aktinomyceten Kolonien, die aber nur unter geeigneten

Tabelle 2.
Einfluß des N-Gehalts auf die Farbe des Luftmycels (Agar-Platten.)

C-Quelle	1 % Glukose								
N-Quelle	KNO_3			Asparagin			Pepton		
N-Quelle — Quantität in %	0,05	0,2	0,5	0,05	0,1	0,5	0,05	0,1	0,5
Act. erythrochromogenes	grau	weiß	weiß	grau	kein L.-M.	kein L.-M.	grau	grau	weiß
Act. griseus	grün-grau	grün-grau	weiß	grün-grau	grün-grau	weiß	grün-grau	grün-grau	weiß
Act. diastaticus	grau	grau	weiß	grau	weiß	weiß	grau	weiß	weiß
Act. cellulosae	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau	grau
Act. roseus	rosa	weiß und rosa	weiß und rosa	weiß und rosa	weiß und rosa	weiß und rosa	rosa	weiß	weiß
Act. albus	weiß	weiß	weiß	grau	weiß	weiß	grau	weiß	weiß
Act. diastatochromogenes	grau	grau	weiß	grau	weiß	weiß	grau	weiß	weiß
Act. flavochromogenes	grau	kein L.-M.	kein L.-M.	weiß und grau	—	weiß und grau	weiß und grau	weiß und grau	weiß
Act. flavus	weiß und grau	weiß	kein L.-M.	—	—	—	weiß und grau	weiß	weiß
Act. parvus	weiß	weiß und gelb	weiß und gelb	weiß-rosa	weiß	—	—	weiß	kein L.-M.
Act. mycroflavus	weiß-rosa	weiß-rosa	—	weiß	weiß	—	—	weiß	kein L.-M.

Bedingungen so typisch sind, daß man auch diese Eigenschaft zur Artdiagnose benutzen kann. So ist z. B. voller Luftzutritt eine wichtige Bedingung guten Aktinomycetenwachstums, und man erhält viel bessere Resultate in Erlenmeyerkolben als in Reagenzröhrchen. Die meisten Arten bilden in Bouillon flockige oder halbkugelige Kolonien, die den Gefäßwandungen aufsitzen, und nur in sehr alten Kulturen bildet sich bei einigen Arten eine Haut. Bouillon ist im allgemeinen nicht günstig für die Bildung von oberflächlichen Kolonien mit Luftmycel.

In zuckerhaltigen Flüssigkeiten, wenn man sie in dünner, 1—1,5 cm hoher Schicht im Erlenmeyerschen Kolben verwendet, ist das Wachstum gewöhnlich stark, und die Form und Größe der Kolonien kann als ein gutes Artmerkmal dienen. Ich habe eine Flüssigkeit von folgender Zusammensetzung benutzt:

Leitungswasser	50 ccm
Glukose	1 %
NH_4NO_3	0,05 %
K_2HPO_4	0,05 %.

Es gibt Arten, die halbkugelige Kolonien bilden, die, in der Flüssigkeit untergetaucht, auf dem Gefäßboden liegen, seltener aber an der Gefäßwandung sitzen. Die Größe der Kugeln ist charakteristisch für die Arten. Die größten, einen Durchmesser von 2—3 mm aufweisenden Kugeln bilden Act. diastaticus (Phot. 1) und Act. viridis. Kleinere Kugeln von 1—2 mm Größe im Durchmesser bildet Act. parvus (Phot. 2), und ganz kleine, im Durchmesser ungefähr 0,5 mm große Kolonien bilden Act. microflavus und flavus.

Ist das Wachstum gut, so erhalten wir eine Masse auf dem Gefäßboden, die aus aneinander gewachsenen Kugeln besteht. Bei den Arten, die kugelige Kolonien bilden, erscheinen bisweilen oberflächliche, schwimmende Kolonien mit einem Luftmycel (Act. diastaticus).

Andere Arten bilden Flocken, die mehr oder weniger fein sind. Sehr feinflockige Kolonien hat z. B. die rote Melanosporeus-Art. Die Arten mit solchem Wachstum bilden gewöhnlich sehr wenig oberflächliche Kolonien (Act. griseus Phot. 3).

Zwei Arten, Act. erythrochromogenes und Act. cellulosae (Phot. 4), bilden formlos zusammengeballte Massen auf dem Gefäßboden und sehr kräftige Oberflächenkolonien, die oft eine, die ganze Oberfläche der Flüssigkeit bedeckende Haut bilden.

Wir werden also für die Artdiagnose drei Typen von Flüssigkeitskolonien unterscheiden: 1. den kugeligen, 2. den flockigen, 3. den formlos zusammengeballten. Die Größe der Kolonien und die Bildung von oberflächlichen Kolonien werden zur weiteren, ins einzelne gehenden Charakterisierung der Arten dienen.

Andere flüssige Nährböden geben ein charakteristisches Wachstum nur für diejenigen Arten, für welche sie geeignet sind, also z. B. stärkehaltige Flüssigkeit für die diastatischen Formen. So wächst z. B. Act. diastaticus in solchen Nährböden sehr kräftig mit Bildung von Oberflächenkolonien.

Die Aktinomycetenkolonien werden durch Verflechtung von verästelten Fäden gebildet. Die Dicke der Fäden ist verschieden; man sieht oft einen dicken Faden neben einem viel feineren. Die Dicke variiert von 0,5—1,2 μ; sie sind oft sehr lang und gekrümmt.

In Flüssigkeiten, auf denen oberflächliche Kolonien mit Luftmycel gebildet wurden, schwimmen gewöhnlich freie Luftsporen. Den Kulturen der kugeligen oder flockigen, untergetauchten Kolonien entnommene Tropfen sind oft ganz frei von Aktinomycetengebilden. Wird aber die Kultur geschüttelt oder wird eine Kolonie herausgeholt und zerdrückt, so bemerken wir kleine, schwimmende, kugelige Gebilde, die in einigen Kulturen zu Zooglöen vereinigt sind. Diese kleinen Gebilde sind viel kleiner als die Luftsporen. Oft schwimmen hier und da kleine, bazillenähnliche Stäbchen, die verschieden lang und manchmal etwas gekrümmt sind. Sie sind nicht als besondere Fortpflanzungsorgane zu betrachten, aber sie können, wie jedes Mycelstück, Fortpflanzungszwecken dienen. Diese Gebilde haben aber gar keine Ähnlichkeit mit den von Neukirch beschriebenen Oidiensporen, die ich in keinem einzigen Falle beobachtet habe. In Agarnährböden habe ich keine derartigen Gebilde gesehen.

Ringbildung. Eine sehr interessante Erscheinung bei den Aktinomyceten ist die Ringbildung. R. Müller[1]) hat schöne Ringbildung bei Act. coelicolor gesehen und meint, daß die wichtigste Bedingung

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 46. p. 195.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

hierfür eine dünne Schicht des Nährbodens ist. In einer Arbeit hat Beijerinck[1]) eine Photographie des Act. annulatus gegeben, wo dieser Organismus auf H_2O-Agar mit 0,05 Proz. NH_4NO_3 und 0,05 Proz. K_2HPO_4 sehr schöne Ringe bildet.

Die Ringbildung, die mehr oder weniger eine allgemeine Eigenschaft der meisten Aktinomyceten ist, kommt bei einigen Arten auf gewöhnlichen Agarnährböden als konzentrisch geordnetes Luftmycel vor. So gibt z. B. Act. parvus auf Glukoseagar mit Asparagin ein konzentrisch geordnetes Luftmycel. Wollen wir eine gute Ringbildung beobachten, so nehmen wir einen sehr armen Nährboden, z. B. Agar allein. Auf solch einem Nährboden entwickeln sich alle Aktinomyceten als durchsichtige Kolonien, die sich mehr an der Oberfläche, als in die Tiefe verbreiten. Das Zentrum des Striches ist mit einem pulverähnlichen Luftmycel bedeckt und von einem durchsichtigen, in den Nährboden hineingewachsenen Rand umgeben. Dieser Rand wächst weiter nach den Seiten, und bald erscheint der erste Ring des Luftmycels. Act. parvus hat unter solchen Bedingungen ungefähr alle 6 Tage einen neuen Ring gebildet, die anderen Arten aber nicht so schnell.

Setzen wir zu dem Agar 0,05 Proz. K_2HPO_4 hinzu, so geht die Ringbildung etwas besser vonstatten, und die Kolonien sind besser entwickelt. Auf Agar mit 0,05 Proz. NH_4NO_3 und K_2HPO_4 bildet sich ein kräftiges Luftmycel von charakteristischer Färbung. Act. griseus bildet ungefähr in 2⅓ Tagen einen neuen Ring, später geht es etwas langsamer. Oft bilden sich Sektormutanten, die ich z. B. bei Act. roseus und Act. cellulosae beobachtet habe. Der letztere bildete einen Mutanten, der weißsporig war und eine sehr feine Struktur zeigte, so daß es schwierig war, eine Ringbildung zu bemerken.

Unter den Aktinomyceten sind gute und schlechte Ringbildner zu unterscheiden. Die Arten Act. cellulosae, griseus und roseus erweisen sich als gute, Act. flavochromogenes als schlechter Ringbildner. Sehr schöne, konzentrische Ringe bilden Act. melanosporeus und melanocyclus auf Zellulose.

Nach R. Müller bilden sich die Luftsporen erst, wenn die vegetativen Fäden ein gewisses Alter erreicht haben, denn sie finden sich nicht an der äußersten Peripherie. Wenn aber die vegetativen Formen die Nährstoffe aufgebraucht haben, so bildet sich kein kreidiger Belag. Diese Erklärung könnte man als richtig gelten lassen, wenn die Ringbildung wirklich nur eine konzentrisch geordnete Luftmycelbildung darstellte. Meine Beobachtungen haben mir aber gezeigt, daß sich die Ringe nicht nur im Luftmycel, sondern auch im vegetativen, in den Agar hineingewachsenen Mycel bilden, so daß das Luftmycel nur dort gebildet wird, wo das vegetative Mycel sich gut entwickelt hat. Somit muß die Ursache der Ringbildung nicht in der Luftmycelbildung, die eine sekundäre Erscheinung ist, sondern im vegetativen Teile der Kolonie liegen.

Schneiden wir eine in Agar eingewachsene Halbkugel der Kolonie radial durch, so bemerken wir konzentrisch geordnete, aufeinanderfolgende, mehr oder weniger dichte Fadengeflechte. Die Figur 5 zeigt fünf solcher Ringe in einer alten Kolonie des Act. cellulosae. In jungen, 1 Woche alten Kolonien habe ich 2—3, in großen, alten 6—7, aber nicht mehr beobachtet. In den Strichkolonien ist die Ringstruktur auch bemerkbar, aber nicht so deutlich, wie in den einkeimigen Kolonien. Bildet sich eine gewöhnliche Agarkolonie, so stehen die Ringe so nahe aneinander, daß man keine Ringe, sondern nur konzentrisch geordnete Farbentöne usw. bemerkt.

---

[1]) Mutation bei Mikroben. Folia Mikrobiologica. I. 1912.

Dort, wo eine dichte Verflechtung vorkommt, bildet sich ein Luftmycelring. Haben wir eine dünne Nährschicht, wie bei den Versuchen von R. Müller, so kann die Kolonie sich nicht in die Tiefe, wohl aber nach den Seiten hin verbreiten. In den Versuchen mit armen Agarnährböden ist der Nährstoffmangel die Ursache, die den Durchmesser der Kolonien vergrößert, da das Mycel sich in einem armen Nährboden schneller verbreitet, als in einem reichen.

Was die Ursache anbelangt, welche die nachfolgende Verfilzung des Mycels bewirkt, so kann man sie vielleicht durch den starken Verbrauch an Nährstoffen erklären, welche das kräftig wachsende Mycel seiner Umgebung entnimmt, wodurch diese Zonen ärmer an Nährstoffen werden und das Mycel kümmerlicher wächst, bis es wieder auf eine reichere Zone trifft und wieder stärker wächst.

Kapitel 4.

Physiologie.

Temperaturoptimum des Wachstums. Die Temperaturverhältnisse der Aktinomyceten habe ich in flüssigen Nährmedien im Erlenmeyerkolben mit 50 ccm einer Glukose-Ammoniumnitratlösung, deren Zusammensetzung auf p. 657 angeführt ist, studiert.

Nur für eine von den studierten Aktinomycetenarten, den Act. citreus, habe ich das optimale Wachstum bei 26° gefunden. Für die Arten Act. erythrochromogenes, roseus, albus, parvus, flavus, microflavus, albosporeus, melanosporeus und melanocyclus liegt die optimale Temperatur des Wachstums bei 30°, für Act. flavochromogenes, griseoflavus, diastatochromogenes, viridis, ruber bei 35°. Act. griseus, diastaticus und cellulosae wachsen ebensogut bei 30°, wie bei 35°. Act. diastaticus wächst auch gut bei 40°, auch noch bei 45°, aber bei 50° nicht mehr; also liegt sein Maximum zwischen 45 und 50°. Für die meisten Arten sind 40° schon das Maximum, und nur Act. diastaticus und Act. cellulosae wachsen bei solcher Temperatur ganz gut, die übrigen aber kümmerlich. Das Minimum habe ich nicht untersucht. Alle Arten wachsen bei Zimmertemperatur langsam, so daß das Minimum niedriger, als bei 18—20° liegt.

Pigmentbildung. Es gibt eine Reihe pigmentbildender Aktinomyceten. Einige von diesen Pigmenten sind in Wasser löslich und diffundieren in die Lösung und in den Agar, die anderen sind in Wasser unlöslich, bleiben in den Zellen und färben die Kolonien oder das Luftmycel. Es gibt rote, gelbe und braune in Wasser lösliche, graue, grünliche, rosa, schwarze, rote und gelbe in Wasser nicht lösliche Pigmente.

Die meisten Pigmente erscheinen am besten auf Agarnährböden, die Glukose oder organische Salze als C-Quelle und 0,05 Proz. einer organischen oder anorganischen N-Quelle enthalten. Einige unlösliche Pigmente erscheinen auch auf Peptonagar, wie z. B. die gelben der Flavus-Gruppe. Auch in Lösungen treten einige Pigmente auf, doch sind flüssige Nährböden für die Pigmentbildung im allgemeinen nicht so günstig, wie Agarnährböden.

So erscheint z. B. in flüssigen Nährböden das gelbe Pigment der Flavus-Gruppe nicht, aber wohl die roten der Micro-Gruppe. Bouillon ist im allgemeinen gar nicht günstig für die Pigmentbildung.

Das schon lange bekannte Chromogenpigment, nach dem eine durch dasselbe charakterisierte Aktinomycetenart benannt ist, kommt nicht nur bei dieser einen vor, sondern findet sich bei mehreren Arten.

Meine Untersuchungen zeigen, daß die Chromogenbildung eine Eigenschaft nicht nur einer, sondern mehrerer Arten darstellt. Ich habe vier-Chromogenes-Arten gefunden. Bekanntlich erscheint das Pigment nur auf eiweißhaltigen Nährböden, die sich braun färben. Wie schon früher Beijerinck gezeigt hat, hängt diese Reaktion mit der Chinonbildung zusammen. Alle Chromogenes-Arten zeigen auch die Chinonreaktion, die aber nicht bei allen gleich stark ist; am stärksten zeigt sie sich bei Act. flavochromogenes. Diese Art verflüssigt die Gelatine nur in den ersten 2 Tagen; später bildet sich eine Chinon-Gelatineverbindung, die sehr fest ist. Bei den übrigen Chromogenes-Arten bemerkte ich diese Eigenschaft nicht; sie zeigen auch eine Bläuung der mit HCl angesäuerten Stärke-IK-Lösung, aber die Reaktion ist bei ihnen schwächer, als bei jenen. Das braune Pigment bildet sich auch in Peptonlösungen und in Bouillon sehr gut.

Alle Chromogenes-Arten färben Kartoffeln schwarz und zeigen die Tyrosinasereaktion. Auf einer Tyrosin-Agarplatte (0,1 Proz. Na-Tyrosinat mit 0,05 Proz. K_2HPO_4) ist die Reaktion nicht deutlich, sehr stark ist sie jedoch, wenn wir eine Tyrosin-Agarplatte mit 0,5 Proz. Pepton oder mit 1 Proz. Glukose und je 0,05 Proz. NH_4NO_3 oder $(NH_4)_2SO_4$ und K_2HPO_4 verwenden.

Das Schwarzwerden der eiweißhaltigen Nährböden ist als Tyrosinasebildung zu erklären, und zwar wirkt die Tyrosinase auf das Tyrosin, welches als Spaltungsprodukt der Eiweißstoffe auftritt. Da das Chinon auch ein oxydierendes Agens ist, können wir die Frage stellen, ob diese zwei oxydierenden Stoffe sich in einer chemischen Verbindung bilden, so daß sie immer nur zusammen vorkommen. Wir haben keine einzige Art gefunden, die Tyrosinasebildung ohne die Chinonreaktion aufwies, nur ist diese letztere bei den verschiedenen Chromogenes-Arten nicht gleich stark, während ich in der Tyrosinasebildung keinen Unterschied zwischen diesen Arten konstatieren konnte. Es ist also wahrscheinlich, daß diese zwei Eigenschaften unabhängig voneinander vorkommen.

Das rote Pigment des Act. erythrochromogenes löst sich gut in Wasser und färbt seinen Nährboden. Das Pigment bildet sich in eiweißfreien Nährböden, besonders gut auf Glukose enthaltenden. Auf Glukose-Agar mit 0,1 Proz. Asparagin färben sich die Kolonien rot, später diffundiert das Pigment in dem Agar. Auch auf Glukose-Ca-Malatagar mit NH_4Cl oder NH_4NO_3 bemerken wir diese Erscheinung, doch nimmt in diesem Falle die Farbe einen violetten Ton an. In einem flüssigen Nährboden aus Leitungswasser mit 1 Proz. Glukose und 0,05 Proz. NH_4NO_3 bekommen wir nach 10—12 Tagen eine rote Färbung der Lösung, die der No. 6 des „Code de couleurs“[1]) entspricht. Auch die Kolonien der Glukose-Asparaginkulturen erhalten diese Farbennummer, wenn sie alt genug sind. Das Pigment löst sich gut in Wasser, ist aber in Alkohol, Äther und Chloroform vollkommen unlöslich und fällt als ein flockiger Niederschlag aus, sobald man Alkohol zu der Wasserlösung hinzufügt. Alkalien- und Säurelösungen verändern die Farbe des Pigmentes nicht.

---

[1]) Klincksieck et Valette, Code de couleurs. Paris 1908.

Das lösliche gelbe Pigment des Act. cellulosae färbt Glukose-, Glyzerin- oder Ca-Malatagar und Glukoselösungen orangegelb. Diese Farbe entspricht der Nr. 161 oder 156 des Farbenkodex. Alkalien verändern die Farbe in eine violettrote. In konzentrierter H_2SO_4 färben sich die gelben Kolonienstücke grünblau.

Die grüngelb-grauen Act. griseus und Act. griseoflavus bilden sehr wenig Pigment, das den Nährboden in alten Kulturen gelblich färbt.

Die gelben Pigmente der Flavus-Gruppe, sowie die roten der Micro-Gruppe sind in Wasser unlöslich. Diese Pigmente treten auch auf alten Agarnährböden und auf Gelatine auf.

Die eiweißhaltigen Nährböden sowie die asparaginhaltigen sind für diese Pigmente günstig. Alle diese Pigmente geben mit konzentrierter H_2SO_4 eine blaue oder grüne Färbung, so daß sie zu der Carotingruppe gerechnet werden müssen.

Bei Act. viridochromogenes auf Ca-Malatagar bekommen die Kolonien eine dunkelgrüne Farbe, die der Nr. 290 des Farbenkodex entspricht. Die Kolonien sind mit weißem Luftmycel bedeckt, durch welches die Farbe der Kolonien durchscheint, wodurch wir einen grünblauen, der No. 371 entsprechenden Farbenton des Luftmycels enthalten. Entfernen wir aber das Luftmycel, so sehen wir die dunkelgrüne Farbe der Kolonien. Auf Glukoseagar sowie auf Peptonagar werden die Kolonien schwarz gefärbt. Das Luftmycel auf solchen Nährböden ist in den ersten Stadien weiß, später aber erhält es eine grünblaue Färbung. In konzentrierter H_2SO_4 verändert sich die grüne Farbe der Kolonie in die rote. Zwei Arten, Act. melanosporeus und melanocyclus, bilden schwarze Luftsporen. Diese schwarzen Pigmente sind in konzentrierter Kalilauge schwach löslich.

Kohlenstoffernährung. Die Aktinomyceten assimilieren viele organische Verbindungen. Man erhält gutes Wachstum auf Nährböden mit Mono-, Di- und Polysacchariden, mit organischen Salzen, sowie mit stickstoffhaltigen organischen Stoffen. Sehr gut wachsen alle Aktinomyceten auf Ca-Malatagar. Nehmen wir ein Gemenge von gleichen Teilen Glukose und Ca-Malat, so bemerken wir, daß viele Arten Ca-Karbonat bilden. In einem Falle hatte Act. erythrochromogenes ein helles Feld gebildet, wo also das früher gebildete $CaCO_3$ gelöst war.

Auf 0,5 Proz. Ca-Chinatagar mit je 0,05 Proz. NH_4Cl und K_2HPO_4 und ein wenig Ferricitrat erhielt ich ein sehr schönes Wachstum mit gut gefärbtem Luftmycel. Act. diastaticus, cellulosae, flavochromogenes und flavus bildeten Protokatechosäure, die mit Eisen eine ein schwarzes Feld bildende Verbindung eingeht. — Bei Act. diastaticus und cellulosae war diese Reaktion am 3. Tage gut bemerkbar, nach ein paar Tagen jedoch verschwunden. Bei Act. flavus und flavochromogenes bildete sich die schwarze Farbe später, aber sie blieb, wie ich beobachtete, noch einige Wochen erhalten.

Alle Arten bilden aus Glukose Säure, insbesondere Act. diastaticus und microflavus. Die Chromogenes-Arten bilden weniger Säure, als die anderen. Act. parvus bildet viel Säure, aber erst in den späteren Entwicklungsstadien. Glukose wird langsam assimiliert. Am schnellsten geht die Assimilation bei Act. erythrochromogenes vor sich; 1 Proz. Glukose in einer Lösung mit je 0,05 Proz. NH_4NO_3 und K_2HPO_4 war am 32. Tage verschwunden, und es hatten sich 89,6 mg Trockensubstanz gebildet. Alle anderen Arten assimilieren die Glukose noch langsamer. Die Glukose wird unter CO_2-Bildung oxydiert. Bei Act. cellulosae, der auch schnell die Glukose assimiliert, habe ich die Atmungskurve in 1 Proz. Glukoselösung bei 35° bestimmt, die am 4. Tage eine der Luftmycelbildung entsprechende Erhebung zeigte; nachher fällt die Kurve und steigt dann wieder langsam bis zum 27. Tage. Die Lösung enthielt noch Glukose, aber keine Spur mineralischer Stickstoffverbindungen. Es waren mehr als 90 Proz. des C ausgeatmet.

Invertase bilden Act. flavochromogenes, parvus, albosporeus, melanosporeus und viridochromogenes. Maltose und Rafinose spalten unsere Arten nicht. Aesculin wird von Act. griseus, griseoflavus, diastaticus, cellulosae, flavochromogenes und flavus gespalten.

Auf einer Stärke-Agarplatte bilden die diastatischen Arten ein helles Feld, wo die Stärkekörner gelöst sind. Messen wir die Felderbreiten, die die Strichkolonien umfassen, so erhalten wir eine Vorstellung von der Größe der Diastasebildung jeder Art. Auf einer Platte mit 4 mm dicker Agarschicht, wo 0,05 Proz. NH_4Cl als N-Quelle dienten, haben die Aktinomyceten nach dreitägigem Wachstum bei 37° Felder von folgender Breite gebildet:

	Breite der Diastasefelder
Act. erythrochromogenes	0 cm
Act. griseus	1,2 „
Act. roseus.	0,6 „
Act. cellulosae	1,4 „
Act. citreus	2,0 „
Act. diastaticus.	1,6 „
Act. griseoflavus	1,0 „
Act. coelicolor	1,0 „
Act. albus	0 „
Act. diastatochromogenes	1,0 „
Act. viridochromogenes	0,8 „
Act. flavochromogenes	0 „
Act. parvus	1,0 „
Act. flavus	1,5 „
Act. ruber	0,8 „
Act. melanosporeus	0,7 „
Act. albosporeus	0,9 „
Act. microflavus	1,6 „

Die stärksten Diastasebildner sind also Act. citreus, diastaticus, flavus und cellulosae; zwei Chromogenes-Arten, Act. erythro- und flavo-chromogenes, bilden gar kein Diastasefeld, zwei andere Chromogenes-Arten sind schwach diastatisch, die übrigen Arten sind mehr oder weniger diastatisch.

Vergleichen wir die Breite der Diastasefelder verschiedener Arten auf Stärke-Agarplatten mit Agarschichten von gleicher Dicke, die verschiedene Stickstoffquellen enthalten, so bekommen wir eine Vorstellung vom Einflusse der verschiedenen Stickstoffquellen auf die Diastasebildung. Für meine Aktinomyceten habe ich folgende Zahlen erhalten (Tab. 3):

Tabelle 3.

Einfluß der Stickstoffquelle auf die Diastasebildung bei den Aktinomyceten.

0,05 %	KNO$_2$	NH$_4$Cl	Asparagin	Pepton
	cm	cm	cm	cm
Act. citreus	1,4	2,0	2,4	2,2
Act. diastaticus.	1,2	1,5	2,1	1,5
Act. cellulosae	1,2	1,4	1,8	1,6
Act. griseus	—	1,1	1,3	1,2
Act. roseus.	0,6	0,6	1,0	0,8
Act. parvus	1,4	1,0	1,0	0,8
Act. flavus	1,1	1,2	1,2	1,2
Act. microflavus	1,2	1,5	2,4	1,2

Am besten wirkt Asparagin, darauf folgt Pepton; die Verschiedenheit zwischen KNO$_3$ und NH$_4$Cl ist nicht deutlich; auf einige Arten wirkt besser das erstere. auf andere das letztere; über die Ursache dieser Erscheinung ist nichts bekannt.

Ich habe die Diastasebildung bei den Aktinomyceten auch in einem löslichem Nährmedium von folgender Zusammensetzung studiert:

Leitungswasser	50 ccm
Stärke	1,0 %
Pepton	0,05 %
K$_2$HPO$_4$	0,05 %

In Erlenmeyerkolben bei 35° habe ich folgende Resultate erhalten (Tab. 4):

Tabelle 4.

Diastasewirkung bei den Aktinomyceten.

	Stärke verschwunden am	Erythroreaktion verschwunden am	Fehlingsche Reaktion verschwunden am
Act. citreus	5. Tage	5. Tage	— Tage
Act. diastaticus	6. „	7. „	11. „
Act. cellulosae	7. „	12. „	18. „
Act. griseus	13. „	25. „	35. „
Act. erythrochromogenes	20. „	27. „	51. „
Act. flavochromogenes	22. „	27. „	60. „
Act. parvus	13. „	16. „	27. „
Act. microflavus	5. „	5. „	—
Act. flavus	8. „	13. „	—

Das allgemeine Bild entspricht den Resultaten der Agarplattenversuche, aber die beiden Chromogenes-Arten, die auf der Platte keine Diastasefelder gebildet haben, sind doch diastatisch; nur geht bei ihnen die Stärkelösung sehr langsam vor sich. Die Arten, die die größten Felder auf Agar bildeten, lösten die Stärke in flüssigen Kulturen am schnellsten. Bei Act. citreus und microflavus verschwindet die Stärke ohne die Erythrophase, bei Act. diastaticus ist die letztere sehr kurz, auch bei Act. parvus verläuft sie sehr schnell, bei anderen dauert sie 5—12 Tage. Das letzte Stadium der ganzen Erscheinung, das Verschwinden des Zuckers, geht nur bei Act. diastaticus schnell vor sich, bei den anderen Arten dauert es länger, so z. B. war bei Act. flavus nach 2½ Monaten noch Zucker vorhanden.

Das Plattenverfahren hat gezeigt, daß Pepton besser auf die Diastasebildung wirkt als NH_4Cl. Auch in löslichen Nährböden erhalten wir mit Pepton eine viel schnellere Diastasewirkung als mit NH_4Cl. Mit NH_4Cl als Stickstoffquelle war die Stärke in einer löslichen Diastaticus-Kultur schon am 6., die Erythro-Reaktion aber erst am 11. Tage verschwunden und die Fehlingsche Reaktion am 36. Tage; also treten mit NH_4Cl die späteren Stadien langsamer auf. Bei anderen Arten währt aber auch das erste Stadium der Stärkelösung unter dem Einflusse von NH_4Cl länger, als mit Pepton, so z. B. war bei Act. griseus die Stärkereaktion am 12. Tage, die Erythro-Reaktion aber noch nach 2½ Monaten deutlich nachweisbar.

Zellulosezersetzung. Es ist schon lange bekannt, daß es Mikroorganismen gibt, die die Zellulose angreifen. Nicht nur die von Omeliansky[1]) studierten anaëroben, sondern auch die aëroben Bakterien können diese wichtige Erscheinung hervorrufen. V. Iterson[2]) beobachtete eine Zellulosezersetzung bei der Denitrifikation, die von einer Bakteriensymbiose hervorgerufen wurde, an der sowohl anaërobe, als auch aërobe Bakterien beteiligt waren. Eine andere Zellulosezersetzung, bei der zwar auch eine Symbiose, aber nur von aëroben Bakterien vorkommt, ist die von van Iterson studierte Erscheinung, der vom Bacillus ferrugineus unter noch nicht aufgeklärten biologischen Bedingungen verursachten braunen Fleckenbildung auf Zellulose.

Unter aëroben Bedingungen wird die Zellulose von vielen Schimmelpilzen, die man sehr leicht aus der Laboratoriumsluft erhalten kann, zersetzt. Unter den thermophilen Bakterien findet man viele Zellulosezersetzer, die unter aëroben Bedingungen wachsen.

Man kennt aber bis jetzt nur wenige nicht thermophile Zellulose zersetzende Bakterien. E. Maerker[3]) hat jüngst zwei Arten, Micrococcus melanocyclus und M. cytophagus, beschrieben, von denen der erstere die Zellulose schwach, der letztere aber stark angreift. Über die erstgenannte Art werde ich weiter unten noch einiges mitteilen.

Jüngst haben Kellerman und McBeth[4]) drei Bakterienarten isoliert, die die Zellulose auf Zelluloseagar angreifen. Omeliansky[5]) ist aber der Ansicht, daß man die „Enzymikzone" als $CaCO_3$-Lösung durch Säurebildung erklären kann. Löhnis und Lockhead[6]) bestätigen aber den Wert der Zellulose-Agarmethode, die sie auch für die Untersuchung der thermophilen Zellulosezersetzer benutzen. Es scheint also, daß die von Kellerman und McBeth isolierten Zellulosezersetzer nicht imstande sind, auf Zellulose ohne Agar zu wachsen.

Polter hat die Zellulosezersetzung bei parasitischen Bakterien konstatiert, die die Zellwand durch die Cytase zersetzen, bevor sie ins Zellinnere eindringen. Es wäre interessant zu wissen, ob diese Organismen auch in vitro die Zellulose anzugreifen vermögen. Die Zellulosezersetzung durch

---

[1]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. p. 193; Bd. 11. 1904. p. 369.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. 1904. p. 689.

[3]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 31. 1912. p. 578.

[4]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. p. 485.

[5]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 36. 1913. p. 472.

[6]) Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. 1913. p. 490.

Aktinomyceten ist nur von Fousek untersucht worden; doch finden wir in seiner Publikation nur die sehr kurze Bemerkung, daß die Zellulose den Aktinomyceten nur als schlechter Nährstoff dient.

Die meisten Aktinomyceten wachsen gut auf Filtrierpapier; nehmen wir in eine Petrischale zwei Filtrierpapierstücke, gießen zwischen dieselben eine Anschwemmung von Leitungswasser mit $MgNH_4PO_4$ und 0,1 Proz. K_2HPO_4, sterilisieren und impfen dann mit Reinkulturen, so bekommen wir nach 3—4 Tagen ein Wachstum, das besonders gut bei den Act. roseus, griseus, cellulosae, diastaticus und bei den kleinen Arten Act. melanocyclus und melanosporeus erfolgt. Alle Arten bilden auf Filtrierpapier ein spezifisch gefärbtes Luftmycel, einige auch Pigment, wie z. B. Act. roseus, welcher ein violett-rosa Pigment, das die Kolonie umgibt, bildet. Act. erythrochromogenes wächst auf der Papierplatte gar nicht, die anderen Chromogenes-Arten aber schwach.

In einer Lösung von Leitungswasser mit je 0,05 Proz. einer anorganischen Stickstoffquelle und K_2HPO_4 und mit Zellulose[1]) geht das Wachstum sehr gut vonstatten. Schon nach 2—3 Tagen schwimmen auf der Oberfläche der Lösung Aktinomycetenkolonien, die bald die ganze Oberfläche bedecken.

Die Zellulose-Agarplatten, die Kellerman und McBeth und Löhnis und Lockhead für die Bakterien verwendet haben, sind für die Aktinomyceten nicht geeignet, da alle Aktinomyceten auf Agar ebenso gut ohne, wie mit Zellulose wachsen. Einige Arten bilden mit K_2HPO_4 und NH_4Cl auf Agar ein helles Feld, das die Kolonie umgibt und wahrscheinlich infolge der Lösung der Phosphate entsteht. Für solche Versuche habe ich Kieselsäureplatten verwendet, die mit Papierbrei oder Papierstaub bedeckt sein können. Da aber Papier für die Beobachtung des Zersetzungsprozesses zu grob ist, habe ich zu diesem Zwecke Zellulosehydrat verwendet, das nach der Xanthogensäure- oder nach der ZnCl-Methode angefertigt wurde. Die Zellulosehydrat-Anschwemmung wird auf die Oberfläche der Platte gegossen, je 0,05 Proz. einer Stickstoffquelle und K_2HPO_4 hinzugefügt und das Wasser zum Verdunsten gebracht.

Auf dieser Zellulosehydrat-Kieselsäureplatte erhielten wir ein sehr gutes Wachstum der Aktinomyceten. Bei Act. cellulosae habe ich eine Erscheinung, die man als eine Enzymdiffusion erklären könnte, gesehen: Jede Kolonie war von einem hellen Felde umfaßt, wo die Zellulose gelöst war. In jedem solchen hellen Feld konstatierte ich aber immer Aktinomycetenhyphen, so daß ich nicht behaupten kann, daß ich wirklich eine Diffusionserscheinung gesehen habe.

Von allen Aktinomyceten greifen die kleinen roten die Zellulose stärker an als die großen Arten. Diese letzteren wachsen auf Filtrierpapier sehr gut, welches dabei aber Monate lang fest bleibt, während Act. melanocyclus und melanosporeus, die schwarze Ringe auf den Papieroberflächen bilden, die Zellulose so stark angreifen, daß die Strichkolonie das Papier dünner macht und der schwarze Kolonienstreifen tiefer liegt als die Papieroberfläche.

Die Aktinomyceten wachsen auch auf Holz. In Kolben, in die Sägespäne in Leitungswasser mit K_2HPO_4 und NH_4Cl getaucht sind, wachsen sie gut. Bearbeiten wir aber das Holz mit verdünnter H_2SO_4 und KOH, so ist auf solchen Präparaten das Wachstum der Aktinomyceten ein viel besseres. Bearbeiten wir aber dieses Präparat, das die Ligninreaktion zeigt, in einer NHO_3-Lösung vom spezifischen Gewicht 1,15, dann erhalten wir eine Holzzellulose, auf welcher die Aktinomyceten ebensogut wachsen, wie auf der Lignozellulose. Ob die Aktinomyceten außer der Zellulose auch das Lignin angreifen, habe ich nicht feststellen können; es scheint aber wohl möglich.

---

[1]) Filtrierpapier oder ein Oxyzellulosepräparat, das aus Baumwolle durch Bearbeitung mit starker Salzsäure hergestellt wurde.

Die Stickstoffernährung der Aktinomyceten. Die Aktinomyceten assimilieren organische und anorganische Stickstoffquellen. Von organischen Quellen dienen die Eiweißstoffe ebenso wie die Amidkörner nicht nur als Stickstoff-, sondern auch als Kohlenstoffquelle.

Auf Ca-Caseïnat-Agarplatten wachsen die Aktinomyceten sehr gut; die meisten bilden ein helles Feld, das seine Entstehung der Wirkung eines proteolytischen Enzyms verdankt. Von den Chromogenes-Arten bilden drei kein helles Feld, ein solches wird aber vom Act. diastatochromogenes gebildet. Am stärksten wird das Kaseïn von Act. microflavus und roseus gelöst. Die kleinen Act. melanosporeus und melanocyclus lösen das Kaseïn schwach, die übrigen merklich. Von allen Arten wird das Kaseïn unter NH_3-Bildung gespalten.

Auch Gelatine wird von den meisten Aktinomyceten angegriffen; auf einer H_2O-Gelatine mit 0,05 Proz. K_2HPO_4 wachsen sie sehr gut und verflüssigen die Gelatine. Act. erythrochromogenes wächst auf solchem Nährboden nicht, die anderen Chromogenes-Arten aber wachsen auf reiner Gelatine ebensogut wie auf Bouillongelatine und bilden auch hier ein braunes Pigment; Act. flavochromogenes bildet auch hier eine feste Gelatineverbindung, so daß die Verflüssigung nicht weiter geht. Von anderen Arten zeigte nur der Act. griseus schwaches Wachstum und Gelatineverflüssigung. Act. ruber wächst kümmerlich, aber dort, wo wir eine Kolonie finden, ist die Gelatineverflüssigung sehr stark; die sehr kleinen Kolonien sitzen in der Tiefe einer trichterförmigen Vertiefung.

Auf Bouillonagar oder Gelatine-Peptonagar, in Bouillon- und Pepton-Lösungen mit K_2HPO_4 wachsen alle Arten sehr gut. Alle spalten Pepton unter NH_3-Bildung in Nährböden, wo es die einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ist. Nehmen wir aber eine Glukoseplatte mit Pepton, so finden wir keine NH_3-Bildung. Dieselbe Erscheinung kann man auch in flüssigen Nährböden konstatieren. — In reinen Peptonlösungen oder in Bouillon finden wir beim Aktinomycetenwachstum immer deutlich NH_3. Aber in den Stärkelösungen, die ich für die Diastasebildung benutzte, habe ich keine Spur von Ammoniak gefunden.

Asparagin ist auch eine gute Stickstoffquelle, die, wie schon früher gesagt, die Diastasebildung begünstigt.

Ureasebildung habe ich bei den Aktinomyceten nicht gefunden.

Die Aktinomyceten assimilieren gut mineralische Stickstoffverbindungen, Ammoniumsalze, Nitrate und Nitrite. NH_4Cl ist nicht immer günstig; ist dieses Salz mit Glukose kombiniert, so erhalten wir auf einer Agarplatte ein schlechtes Wachstum, das wahrscheinlich durch die Säurereaktion des Nährbodens veranlaßt wird.

Nitrate werden von den meisten Arten zu Nitriten reduziert. Diese Erscheinung kann man auf einer Stärkeplatte mit 0,05 Proz. KNO_3 als Stickstoffquelle konstatieren. Wird eine solche Platte am 2. oder 3. Tage des Aktinomycetenwachstums mit einer mit HCl angesäuerten IK-Lösung übergossen, so bemerken wir Blaufärbung der Stärke. In einem Nährboden von Leitungswasser mit 1 Proz. Glukose, 0,05 Proz. K_2HPO_4 und 0,05 Proz. NH_4NO_3 als Stickstoffquelle konstatierten wir gewöhnlich schon in den ersten Tagen des Aktinomycetenwachstums die Anwesenheit von Nitrit. Die Veränderungen der Stickstoffverbindungen finden wir in Tabelle 5.

Tabelle 5.
Reduktion der Nitrate bei Aktinomyceten.

	Nitrat verschwunden am	Nitrit verschwunden am	Ammoniak verschwunden am
Act. erythrochromogenes	14. Tage	3. Tage	14. Tage
Act. griseus	14. „	34. „	—
Act. diastaticus	34. „	3. „	—
Act. roseus	20. „	34. „	—
Act. flavochromogenes	29. „	—	—
Act. flavus	—	K. N.	—
Act. parvus	12. „	K. N.	12. Tage
Act. microflavus	29. „	K. N.	—

Bei Act. erythrochromogenes und diastaticus erscheint das Nitrit schon nach 24 Stunden; die Nitritreaktion ist noch einen Tag deutlich, um sodann für die weitere Dauer des Versuches zu verschwinden; Bei Act. griseus und Proseus ist die Nitratreduktion am stärksten; bei Act. Proseus erscheint Nitrit nach 24 Stunden; dann ist immer Nitrit in der Lösung vorhanden. Am 14. Tage ist alles Nitrat verschwunden, nach 34 Tagen auch das Nitrit; die Ammoniakreaktion ist noch nach 2 Monaten deutlich. Bei Act. Proseus verschwindet das Nitrat sehr langsam, so daß wir noch nach 2 Monaten Nitrat, Ammoniak sowie Nitrit, das wir im Laufe des ganzen Versuchs finden, in der Lösung haben. Bei den übrigen Arten habe ich kein Nitrit gefunden. Ein Verschwinden des Ammoniaks habe ich bei Act. erythrochromogenes und parvus konstatiert; bei den übrigen geht die Erscheinung der Ammoniumassimilation so langsam vor sich, daß es noch 2 Monate lang vorhanden war.

Es gibt also unter den untersuchten Aktinomyceten 2 Arten, die den Stickstoff sehr schnell assimilieren; bei Act. erythrochromogenes war 4 Tage nach dem Verschwinden der letzten Stickstoffspur aus der Lösung auch aller Zucker verbraucht, bei Act. parvus war aber der Zucker noch nach 2 Monaten vorhanden. Die erstere Art, bei welcher ich Nitrit nur am Anfange des Versuches gefunden habe, ist also eine Nitrat reduzierende Art, und es ist wahrscheinlich, daß bei dieser die Nitratreduktion im Laufe des ganzen Versuches erfolgt, alles gebildete Nitrit aber durch den Organismus assimiliert wird.

Act. parvus, der allen Stickstoff der Lösung viel früher absorbierte als den Zucker, hat wahrscheinlich eine größere Stickstoffzahl[1]) als Act. erythrochromogenes, bei dem diese beiden Momente einander sehr nahe stehen. Bei Act. parvus habe ich die Erscheinung der Absorption, die Waterman bei Aspergillus niger konstatiert hat, beobachtet: In einer Lösung, die nach 12 Tagen ganz frei von

---

[1]) Waterman, H. J., Koninkl. Akad. v. wetensch. te Amsterdam. Proceed. of the Meet. of Febr. 22. 1913. p. 1047.

Stickstoffverbindungen war, habe ich am 25. Tage wieder NH_3 gefunden, den die Zellen abschieden, und weiterhin blieb die NH_3-Reaktion bis zum Ende des Versuchs deutlich.

Es ist möglich, daß nicht nur Act. erythrochromogenes, sondern auch andere Arten die Fähigkeit besitzen, Nitrat zu reduzieren, die aber so schwach ist, daß alles Nitrit von den Zellen assimiliert wird. Ein Versuch mit KNO_3 bestätigte diese Vermutung.

Bringen wir KNO_3 anstatt NH_4NO_3 in die Lösung, so konstatieren wir auch Nitratreduktion bei den einen und keine Nitritbildung bei den anderen Aktinomyceten. Bei 30° bilden Act. erythrochromogenes, Act. cellulosae und Act. flavus kein Nitrit, aber bei Act. cellulosae konstatierte ich bei 35° die Anwesenheit von Nitrit. Diese Erscheinung ist so zu erklären, daß bei der Optimaltemperatur die Nitritassimilation so schnell vor sich geht, daß alles sich bildende Nitrit assimiliert wird; doch kann bei einer Temperatur, die höher als das Optimum ist, die Reduktion ebenso schnell, die Nitritassimilation aber langsamer erfolgen, so daß nicht verbrauchtes Nitrit sich in der Lösung anhäuft.

In Bouillon mit 0,5 Proz. KNO_3 erhalten wir die Nitritreaktion bei allen Actinomyces-Arten schon nach 24 Stunden, Act. flavus ausgenommen, die die einzige ist, die nicht die Fähigkeit besitzt, Nitrat zu reduzieren. In Reagenzgläschen mit 10 ccm Nitratbouillon verschwand das Nitrat bei Act. flavochromogenes, griseus, roseus, parvus am 12. Tage, bei Act. microflavus am 20., bei Act. erythrochromogenes am 29., bei den übrigen noch später. Nachdem das Nitrat verschwunden war, war die Nitritreaktion bis zum Ende des Versuches, der mehr als 2½ Monate dauerte, sehr deutlich. Auch in Nitritbouillon (0,1 Proz. KNO_2) konnte ich das Verschwinden des Nitrits kein einziges Mal bemerken, obschon der Versuch sehr lange dauerte.

Diese Versuchsreihe bestätigt also die Vermutung, daß bei vielen Actinomyces-Arten die Nitratreduktion so langsam vor sich geht, daß das sich bildende Nitrit sofort in den Zellen assimiliert wird.

In keinem Falle konnte ich Ammoniakbildung aus Nitrat oder Nitrit erhalten, was auch Fousek konstatierte.

Diese Versuchsreihe hat also gezeigt, daß nur eine Actinomyces-Art, Act. flavus, nicht Nitrate reduziert. Alle anderen besitzen diese Fähigkeit, die ihnen aber in verschiedenem Grade zukommt. Wir können also die Aktinomyceten als stark, schwach und gar nicht Nitrat reduzierend charakterisieren. Zu den stark reduzierenden gehören die Arten, die eine Nitritreaktion nicht nur in Bouillon, sondern auch in Glukoselösung zeigen, zu den schwach reduzierenden diejenigen, bei welchen wir während des Versuches das Nitrit gar nicht oder nicht immer in der Glukoselösung finden.

Kapitel 5.

Systematisches.

Ich mußte meine Arten mit den bisher beschriebenen Spezies identifizieren. Da man sie bisher aber nur auf den gewöhnlich von den medizinischen Bakteriologen benutzten Nährböden kultivierte, wo die spezifischen Merkmale der Arten nicht erscheinen, so ist anzunehmen, daß man unter einem und demselben Namen verschiedene Arten vereinigt hat. So unterscheidet schon Neukirch zwei Chromogenes-Gruppen, aber die von ihm

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

gegebene Charakteristik der Gruppen ist so unvollkommen, daß dieser Forscher die Gruppen nach ihrem Geruch unterscheidet. Ich habe aber 4 verschiedene Chromogenes-Arten gefunden, die sich ganz gut voneinander unterscheiden lassen. Ebenso sind unter dem Namen Act. albus alle Aktinomyceten vereinigt, die auf stickstoffreichen Nährböden ein weißes Luftmycel und ungefärbte Kolonien bilden. Einige Arten sind durch ihr Pigment leicht erkennbar, wie z. B. Act. coelicolor R. Müller, aber die meisten der beschriebenen Arten, wie z. B. die in der Literatur beschriebenen Arten mit gelben Kolonien, konnte ich wegen der unvollständigen Diagnose mit den meinigen nicht identifizieren.

Die meisten Aktinomyceten habe ich aus Gartenerde isoliert und ungefähr 20 verschiedene Arten gefunden. In der Literatur sind mehr als 40 Aktinomycetenarten beschrieben, von denen einige nur oberflächlich untersucht sind, so daß „durch sorgfältige analytische und vergleichende Untersuchungen viele dieser Spezies mit schon bekannten identifiziert werden und die Zahl der angegebenen Streptothricheen sicherlich beschränkt werden würde“[1]). — Sollte man aber wirklich einige identische unter den angegebenen Aktinomycetenarten finden, so denke ich, daß anderseits viele derselben in mehrere neue zerfallen werden, wie z. B. Act. chromogenes, wenn die gefundenen Arten erst gut charakterisiert sein werden. Ich habe den Eindruck, daß diese Mikroorganismenfamilie eine sehr artenreiche ist, was schon a priori aus der Verbreitung dieser Mikroorganismen in der Natur gefolgert werden kann.

Es ist oben bereits gezeigt worden, daß die morphologischen Eigenschaften, so z. B. die Größe und Farbe der Kolonien, sowie die Farbe des Luftmycels unter geeigneten Wachstumsbedingungen für jede Art genügend charakteristisch sind, so daß sie zur vorläufigen Identifizierung der Arten dienen können. Die physiologischen Eigenschaften, durch die sich die Arten voneinander unterscheiden, können auch als Artenmerkmale und zur Identifizierung der Arten dienen. Jede Art soll also morphologisch und physiologisch charakterisiert werden.

Beim Vornehmen einer Gruppierung der Aktinomyceten stoßen wir auf Schwierigkeiten, da die Eigenschaften der einen Gruppe auch bei anderen vorkommen. So z. B. teilt Sanfelice[2]) die Aktinomyceten nach der Farbe der Kolonien in 3 Gruppen: 1. die Albus-Gruppe, zu der alle Arten gehören, die auf Agar (Bouillonagar) mattweiße Kolonien mit kreideähnlichem Belag bilden; 2. die Flavus-Gruppe, die diejenigen Arten umfaßt, die gelbe Oberflächenkolonien auf demselben Agar bilden, und 3. die Violaceus-Gruppe, zu der man diejenigen Arten zu rechnen hat, die in die beiden ersten Gruppen nicht hineinpassen, wie z. B. Streptothrix viridis.

Unter den von mir studierten Aktinomyceten sind 4, die auf verschiedenen Agarnährböden gelbe Kolonien bilden und also der Sanfeliceschen Flavus-Gruppe zuzuzählen sind. Aber diese 4 Arten weisen so verschiedene morphologische und physiologische Eigenschaften auf, daß meine Flavus-Gruppe, als eine durchaus künstliche zu betrachten sein dürfte.

Andererseits erscheint ein so wichtiges Merkmal, wie z. B. die Chromogenbildung, als eine Eigenschaft, die nicht nur den gelben, sondern auch den anders gefärbten Gruppen zukommt. Wir dürfen also nicht die Farbe der Kolonien der Klassifikation zugrunde legen.

---

[1]) Caminiti, Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 44. p. 198.

[2]) Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 36 u. 38.

Es scheint, daß wir die Möglichkeit haben, unsere Arten in 2 oder 3 Gruppen zu ordnen, und daß diese Gruppierung nicht nur ein künstliches Hilfsmittel darstellt, sondern auch mehr oder weniger der natürlichen entspricht. Auf Ca-Malatagarplatten erscheinen sofort nach der Impfung die großen Arten, die ein typisch gefärbtes Luftmycel bilden, das früher oder später auftritt. Bleibt die Platte lange Zeit liegen, so erscheint eine Menge kleiner Kolonien, die ich schon früher als Aktinomyceten der Mikrogruppe charakterisiert habe. Wir haben bereits gesehen, daß diese Arten sich von den großen Arten nicht nur durch ihre Größe, sondern auch z. B. durch die Form der Luftsporen, die immer genau kugelig sind, unterscheiden. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sämtliche Vertreter dieser Gruppe sich als stärkste Zellulosezersetzer erweisen werden, und daß alle Organismen dieser Gruppe rot, violett oder gelb gefärbt sind und also die Pigmente der Karotingruppe besitzen.

Es ist aber schwierig, die beiden gelben Arten mit kleinen Kolonien, die nach der Größe ihrer Kolonien, Farbe und Luftmycelbildung eher zu der Mikro-, als zu der Makrogruppe gehören dürften, unterzubringen, denn sie sind keine starken Zellulosezersetzer und ihre Sporenform ist für die Mikrogruppe nicht typisch genug. Act. parvus müssen wir als eine Übergangsform betrachten, aber Act. microflavus hat so spezifische Merkmale, wie z. B. die Eigenschaften des Luftmycels, daß es höchstwahrscheinlich ist, daß wir eine nur uns bekannte Art einer besonderen Aktinomycetengruppe haben. Doch kann diese Art vorläufig auch zu der Mikrogruppe gerechnet werden.

Zur weiteren Gruppierung können die Färbung der Kolonien und des Luftmycels, sowie einige physiologische Merkmale dienen. Für die Bestimmung der Actinomyces-Arten geben wir eine Tabelle, in der die wichtigsten Artmerkmale verzeichnet sind.

Beschreibung der Aktinomycetenarten. Actinomyces erythrochromogenes habe ich als einen gewöhnlichen Gartenerdebewohner und auch auf Alnus-Wurzel gefunden. Temperaturoptimum 30°.

Auf Ca-Malatagar (H_2O-Agar, 1 Pr. Ca-Malat, je 0,05 Proz. NH_4Cl und K_2HPO_4) bildet er mittelgroße, 1,5—3 mm große Kolonien mit grauem, weißrandigem Luftmycel.

Auf Stärkeagar (H_2O-Agar, 1 Proz. Stärke, je 0,05 Proz. NH_4Cl und K_2HPO_4) ähneln die Kulturen ganz denen auf Ca-Malatagar, aber die Farbe des Luftmycels entspricht jetzt der Nummer 114 oder 115 des Farbenkodex, während ich für die Farbe des Luftmycels auf Ca-Malatagar keine entsprechende Nummer finden konnte. In alten Kulturen bemerken wir ein rosafarbenes Pigment, das den Agar färbt.

Dieselbe Farbe des Luftmycels bleibt auch auf Glukoseagar (H_2O-Agar, 1 Proz. Glukose, je 0,05 Proz. NH_4Cl, KNO_3, Asparagin oder Pepton). Wird das Stickstoffquantum erhöht, so wird das Luftmycel weiß und später gebildet. 0,1—0,2 Proz. Asparagin ist besonders für die rote Pigmentbildung günstig, worauf bereits früher hingewiesen wurde.

Auf Glukose-Ca-Malatagar (H_2O-Agar, 1 Proz. Glukose, 1 Proz. Ca-Malat, je 0,05 Proz. K_2HPO_4 und NH_4Cl oder NH_4NO_3) wird das Luftmycel schlecht gebildet, aber das rote Pigment färbt nicht nur den Nährboden, sondern auch die Kolonien.

Auf eiweißhaltigem Agar bildet sich braunes Pigment, das den Agar färbt. Auf solchen Nährböden wird ein graues Luftmycel erst nach 2 Monaten gebildet. Besonders auf Ca-Kaseïnatagar bildet weißes Luftmycel sich gut, auf Peptonagar aber spät.

Auf Bouillongelatine wächst diese Art langsam, verflüssigt die Gelatine bildet braunes Pigment und gibt eine schwache, doch deutliche Chinon-Reaktion.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Tabelle 6. Kurze Charakteristik

1. Gruppe. Macro-Actinomycetes. Auf Agarnährböden sind die einkeimigen Nährboden typisch gefärbt, bei großem N-Gehalt weiß. In Glukoselösung sind die Kolonien Zellulose, die sie aber nur

2. Gruppe. Micro-Actinomycetes. Auf Agarnährböden sind die einkeimigen sind die Kolonien gewöhnlich gefärbt, die Lösung

Morphologische und physiologische Merkmale	Ca-Malat- oder Glukose-agar			Pepton- oder Bouillonagar	
Name der Arten	Kolonien-Farbe	Luftmycel-Farbe	Luftmycel erscheint	Chromogen und Chinon-Bildung[2]	Farbe der Kolonien
1. Gruppe Macro-Actinomycet.					
Act. erythrochromogenes . .	ungefärbt	grau No. 114/5	früh	+	ungefärbt
Act. griseus	ungefärbt	grüngrau No. 173/4	früh	—	ungefärbt
Act. diastaticus	ungefärbt	grau No. 143	früh	—	ungefärbt
Act. roseus	ungefärbt	rosa No. 021	früh	—	ungefärbt
Act. cellolosae	ungefärbt	grau No. 143	früh	—	ungefärbt
Act. albus	ungefärbt	weiß	früh	—	ungefärbt
Act. diastatochromogenes .	ungefärbt	grau	früh	+	ungefärbt
Act. citreus	hellgelb No. 271	hellgelb No. 271	früh	—	gelb
Act. griseoflavus	gelb	grau-grün No. 173/4	früh	—	gelb
Act. viridochromegenes . .	dunkelgrün No. 290	weiß	früh	+	grau
Act. flavochromegenes . . .	gelb No. 156	weiß und grau	spät	+	gelb
Act. flavus	gelb No. 156—171	grau und weiß	spät	—	gelb
2. Gruppe Micro-Actinomycet.					
Act. parvus	gelb No. 161/6-171	hellgelb	spät	—	gelb
Act. microflavus	gelb No. 153	hellgelb	spät	—	gelb
Act. ruber	rot No. 81—86	rot	spät	—	rot No. 136
Act. melanosporeus	rot No. 111	schwarz	früh	—	orangerot No. 102
Act. melanocyclus	rot No. 111	schwarz	früh	—	orange-rot
Act. albosporeus	rot No. 126	weiß	früh	—	rot

Auf Kartoffeln bildet sie Kolonien mit grauem Luftmycel. Die Kartoffel färbt sich schwarz.

In Glukoselösung (Leitungswasser 50 ccm, Glukose 1 Proz., NH_4NO_3 0,05 Proz., K_2HPO_4 0,05 Proz. im Erlenmeyer-Kolben) ist das Wachstum sehr kräftig: Auf dem Gefäßboden bildet sich eine grobflockige Masse, auf der Oberfläche

---

[1] 1. Typus — kugelige Kolonien, 2. Typus — flockige Kolonien, 3. Typus —

[2] +— schwach, ++ stark, +++ sehr stark, — keine Reaktion oder kein

der Aktinomyceten.

Kolonien groß (gewöhnlich 3—5 mm), gefärbt oder ungefärbt. Luftmycel auf geeignetem gewöhnlich ungefärbt, bei einigen wird die Lösung gefärbt. Einige wachsen kräftig auf schwach angreifen.

Kolonien klein (weniger als 3 mm); Kolonien und Luftmycel gefärbt. In Glukoselösung jedoch nicht. Zellulose wird stark angegriffen.

1 % Glukoselösung (Mit 0,05 % NH_4NO_3)			Invertase[2])	Diastase[2])	Aeskulinspaltung[2])	Zellulosezersetzung[2])	Protokatechosäurebildung[2])	Proteolytische Wirkung[2])	Nitratreduktion[2])
Typus[1]) der Kolonien	Luft-Mycel[2])	Farbe der Lösung							
3	+	rot No. 6	—	—	—	—	—	+	+
2	+	ungefärbt	—	++	+	+	—	++	++
1	+	ungefärbt	—	+++	+	+	+	++	+
2	—	ungefärbt	—	+	—	+	—	++	++
3	+	gelb N. 151-161	—	+++	+	+	+	++	+
2	—	ungefärbt	—	—	—	?	—	++	++
2	+	ungefärbt	—	+	—	?	—	++	++
1	+	ungefärbt	—	+++	—	?	—	++	+
2	+	ungefärbt	—	+	+	+	—	++	++
1	—	ungefärbt	—	+	—	?	—	+	++
2	—	ungefärbt	+	+	+	+—	—	+	++
2	—	ungefärbt	—	++	+	+—	+	++	—
1	—	ungefärbt	—	+	+	+—	—	++	+
1	—	ungefärbt	—	+++	—	+—	—	++	+
1	—	ungefärbt	—	+	—	++	—	++	+
2	—	ungefärbt	—	+	—	++	—	+	++
1	—	ungefärbt	—	+	—	++	—	++	+
3	+	ungefärbt	—	+	—	?	—	++	++

schwimmen Kolonien mit anfänglich weißem, später grauem Luftmycel Die rote Färbung der Lösung tritt am 3.—4. Tage auf. Nach 2—3 Wochen wird sie, entsprechend der No. 6 des Farbenkodex, intensiv rot gefärbt. Die Kolonien sind auch in alten Kulturen rot gefärbt.

formlos zusammengeballte Kolonien.
Luftmycel.

In Bouillon ist das Wachstum flockig, später bildet sich eine Haut; die Bouillon wird braun gefärbt.

Luftsporen oval. Längsdurchmesser 2 μ.

Die Art ist schwach diastatisch, bildet wenig Säure. Glukose wird schnell verbraucht. 0,05 Proz. Ammoniumnitrat wird fast ebenso schnell, wie Glukose assimiliert. Sie reduziert die Nitrate schwach, bildet kein kaseïnlösendes Enzym und wächst nicht auf reiner Gelatine. Auf Filtrierpapier habe ich kein Wachstum gesehen.

Actinomyces griseus. Gefunden in Gartenerde und stets und sehr reichlich in Buchenlaub. Aus Gartenerde habe ich ihn zusammen mit Act. cellulosae mit Hilfe des Zelluloseverfahrens bei 40° angehäuft.

Auf Ca-Malatagar bildet diese Art bis 5 mm große Kolonien mit sehr gut ausgebildetem, gelblich-grünlich-grauem Luftmycel, dessen Farbe der No. 173 oder 174 des Farbenkodex entspricht. Das Zentrum ist oft weißgerändert; gewöhnlich bleibt der Kolonienrand frei von Luftmycel.

Auf Stärke- und Glukoseagar mit 0,05 Proz. einer Stickstoffquelle bleibt die Farbe unverändert. Sie verändert sich nach der allgemeinen Regel, wenn das Stickstoffquantum sich vergrößert, doch bildet sich das Luftmycel auch bei großem Stickstoffgehalt; es ist dann aber weiß und färbt sich erst nach ungefähr 1 Monat.

Auf Bouillon- und Peptonagar bildet sich das Luftmycel entweder gar nicht, oder erst sehr spät erscheint ein kreideähnlicher Belag.

Auf Bouillongelatine sind die Kolonien schwach grau, ohne Luftmycel. Gelatine wird nur langsam verflüssigt.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien schwach grau mit grau-weißem Luftmycel.

In Glukoselösung sind die untergetauchten Kolonien flockig, die oberflächlichen bilden sich spät und spärlich. Den gleichen Wachstumscharakter zeigt diese Art auch in Stärkeflüssigkeit.

Die Luftsporen sind oval; Längsdurchmesser 1,2 μ.

Diese Art bildet keine Invertase, spaltet Aeskulin, gehört zu den mittelstarken Diastasebildnern und wächst sehr gut auf Zellulose. Gelatine wird schwach, Ca-Kaseïnat stark verflüssigt. Nitrate reduziert er stark. In alten Kulturen wird ein wenig grüngelbes Pigment gebildet.

Actinomyces diastaticus. Diese Art gehört auch zu den gewöhnlichen Gartenerdeorganismen und kann auf einer Ca-Malatagarplatte, sowie nach dem Anhäufungsverfahren mit Stärke erhalten werden.

Auf Ca-Malatagar zeigen die 2—4 mm großen Kolonien ein zentrales, graues Luftmycel, einen weißen Luftmycelrand und einen luftmycelfreien Rand. Oft bildet diese Art auf dem grauen Luftmycel weiße Flocken, aus denen ich einen weißsporigen Mutanten isolierte. Die Farbe des Luftmycels entspricht der No. 143 des Farbenkodex. In alten Kulturen erhalten die Kolonien eine schwach gelbe Färbung.

Auf Glukose- und Stärkeagar bleibt die Farbe unverändert; wird aber das Stickstoffquantum erhöht, so erhalten wir eine Veränderung der Farbe und verspätete Luftmycelbildung nach der allgemeinen Regel.

Auf Pepton- und Bouillonagar erscheint das Luftmycel nach 2—3 Wochen. Zuerst weiß, färbt es sich nach einigen Wochen grau.

Bouillongelatine wird verflüssigt.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien weißgrau; Luftmycel grau und weiß.

In Glukoselösung bildet Actinomyces diastaticus 1,5 bis 3 mm große, halbkugelige Kolonien, die dem Gefäßboden oder der Gefäßwand aufsitzen. Später erscheinen oberflächliche Kolonien mit Luftmycel.

Die Stärkelösung, in der diese Art sich stark entwickelt und schönes, graues Luftmycel bildet, wird nach 5—7 Tagen braun gefärbt.

Die Luftsporen sind kugelig oder oval, 1,6 μ groß.

Diese Art ist stark diastatisch. Invertase wird nicht gebildet, Aeskulin wird gespalten, Ca-Chinat zu Protokatechosäure oxydiert. Auf Zellulose ist das Wachstum sehr gut.

Sie gehört zu den schwach Nitrat reduzierenden Arten, d. h. man findet eine Nitritbildung in Bouillon, aber nicht in Glukoselösung. Eine proteolytische Wirkung habe ich auf Ca-Kaseïnat und Gelatine konstatiert.

Actinomyces roseus. Diese Art habe ich in Gartenerde gefunden.

Auf Ca-Malatagar sind die mittelgroßen Kolonien von einem rosa Luftmycel bedeckt. Die Farbe des Luftmycels wechselt von weiß bis rosa.

Auf Glukose- und Stärkeagar bleibt die Farbe unverändert; die Farbenveränderung folgt der allgemeinen Regel.

Auf Bouillon-, Pepton- und Ca-Kaseïnatagar erscheint weißes Luftmycel erst sehr spät.

Auf Bouillongelatine sind die Kolonien gelblich, auf ihrer Oberfläche bilden sich konzentrische Kreise. Die Gelatine wird verflüssigt.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien gelblich, mit weißem Luftmycel.

In Glukoselösung sitzen die kleinflockigen Kolonien am Gefäßboden; in alten Kulturen färbt sich die Flüssigkeit schwach gelblich.

Luftsporen länglich, 1,1 μ breit und 1,5—2 μ lang; oft sind sie kettenähnlich angeordnet.

Actinomyces roseus wächst sehr gut auf Zellulose. Die Kolonie bildet einen rosa gefärbten Fleck, der von einem violett-rosa Pigment umrandet ist. Die Art ist schwach diastatisch, reduziert Nitrate stark und bildet stark wirkende proteolytische Enzyme.

Actinomyces cellulosae wird aus Gartenerde mit Hilfe des Zelluloseverfahrens angehäuft.

Auf Ca-Malatagar sind die mittelgroßen Kolonien gelblich, das Luftmycel ist grau, wie das des Actinomyces diastaticus, der No. 143 des Farbenkodex entsprechend gefärbt.

Auf Glukose- und Stärkeagar ist der Farbenton etwas verändert. Das Luftmycel ist sehr kräftig und bleibt auch bei größerem Stickstoffquantum unverändert, so z. B. noch bei 0,5 Proz. Asparagingehalt. Auf diesen Nährböden, sowie auf Ca-Malat-Glukoseagar scheidet diese Art ein gelbes Pigment aus, das den Nährboden und die Kolonie färbt.

Auf Bouillonagar wird weißes Luftmycel, aber erst spät gebildet, auf 0,5 Proz. Peptonagar erscheint der kreidige Belag dagegen schon in den ersten Tagen.

Bouillongelatine wird verflüssigt. Die Kolonien sind gelblich.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien hellgrau; das Luftmycel ist grau.

In Glukoselösung sind die untergetauchten Kolonien grobflockig, wie die von Actinomyces erythrochromogenes; auf der Oberfläche schwimmen runde, mit grauem Luftmycel bedeckte Kolonien. Das gelbe Pigment tritt schon nach 2—3 Tagen auf. Nach einigen Wochen ist die Lösung, No. 161 oder 156 des Farbenkodex entsprechend, intensiv gelb gefärbt.

In Stärkeflüssigkeit, in der die untergetauchten Kolonien grobkörnig, die oberflächlichen mit grauem Luftmycel bedeckt sind, färbt sich die Lösung hellbraun.

Die Luftsporen sind fast genau kugelig, 1,3 μ groß, oft in Ketten angeordnet.

Auf Zellulose wächst diese Art sehr gut; sie ist stark diastatisch, spaltet Aeskulin und oxydiert Ca-Chinat.

Sie gehört zu den schwach Nitrat reduzierenden Arten und bildet starke proteolytische Enzyme.

Actinomyces albus habe ich aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar bildet diese Art sehr charakteristische, mittelgroße Kolonien, die nur im Zentrum von weißem Luftmycel bedeckt sind. Eine Strichkolonie bildet also in der Mitte der Kolonienoberfläche einen weißen, schmalen Luftmycelstreifen.

Auf Stärkeagar bleibt die weiße Farbe des Luftmycels unverändert, bedeckt aber die ganze Oberfläche der Kolonie.

Auf Glukoseagar wird das Luftmycel grau gefärbt; seine Farbe verändert sich nach den allgemeinen Regeln.

Auf Pepton- und Bouillonagar sind die Kolonien frei von Luftmycel, oder es bildet sich spät ein kreidiger Belag.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien und das Luftmycel weiß, auf Bouillongelatine hellgrau; die Gelatine wird verflüssigt.

In Glukoselösung bildet diese Art flockige Kolonien und spärliche weiße Oberflächenkolonien.

Die Luftsporen sind oval, 1 μ lang. Auf Zellulose habe ich kein Wachstum gesehen; auf Stärkeplatten zeigt sie sich nicht diastatisch. Sie reduziert die Nitrate stark: ihre proteolytischen Enzyme wirken stark.

Actinomyces diastatochromogenes. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar sind die Kolonien mittelgroß, ungefärbt, das Luftmycel grau. Auf Ca-Malat-Glukoseagar wird das Zentrum des Luftmycels gelblich gefärbt und von einem grauen Ring umfaßt.

Auf Glukose- und Stärkeagar ist das Luftmycel grau. Auch bei hohem Stickstoffgehalt ist das Luftmycel auf Glukoseagar schwach grau.

Auf Peptonagar (0,5 Proz.) sind die Kolonien mittelgroß, mit weißem, später hellgrauem Luftmycel bedeckt. Sie bilden ein braunes Pigment, das den Nährboden färbt.

Bouillongelatine wird durch die hellgrauen Kolonien verflüssigt; sie scheiden auch braunes Pigment ab.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien hellgrau; das Luftmycel ist grau. Die Kartoffeln werden schwarz gefärbt.

In der Glukoselösung sind die untergetauchten Kolonien flockig, später bilden sich Oberflächenkolonien.

Die Luftsporen sind kugelig, es werden aber auch ovale, 1,2 μ große, angetroffen.

Ich habe kein Wachstum auf Zellulose erhalten. Diese Art ist schwach diastatisch. Nitrate reduziert sie stark, hat starke proteolytische Wirkung und scheidet Tyrosinase ab.

Actinomyces citreus. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar sind die Kolonien zitronengelb, der No. 271 des Farbenkodex entsprechend. Die Kolonien sind mittelgroß, mit gut gebildetem Luftmycel, das die gleiche Farbe, wie die Kolonien aufweist.

Auf Ca-Malatglukose, Glukose- und Stärkeagar erhält diese Art dieselbe Farbe. Bei großem Stickstoffgehalt erscheint das Luftmycel später und weist seine typische Farbe auf.

Auf Bouillon- und Peptonagar ist die Kolonie gelblich, mit schwachem, auf den Rändern der Kolonien gebildetem, weißem Luftmycel, das später nach 10—12 Tagen die ganze Oberfläche der Kolonien bedeckt.

Auf Kartoffeln ist sein Wachstum stark; die Kolonien sind gelblich, das Luftmycel weiß gefärbt.

Auf Bouillongelatine sind die flachen, gelblichen Kolonien mit weißem Luftmycel bedeckt; Gelatine wird verflüssigt.

In Glukoselösung sind die untergetauchten, 1½—3 mm großen Kolonien kugelig. Nach 5—6 Tagen erscheinen auf der Oberfläche der Flüssigkeit kleine, flache Kolonien mit weißem Luftmycel.

Die Stärkeflüssigkeit färbt sich gelblich.

Die Luftsporen sind kugelig, 1 μ groß.

Auf Zellulose habe ich kein Wachstum erhalten. Actinomyces citreus ist die stärkste Diastase bildende Art; sie wirkt schwach reduzierend auf Nitrate, die proteolytische Wirkung ist stark.

Actinomyces griseoflavus. Aus Gartenerde isoliert.

Die Kolonien auf Ca-Malatagar sind sofort nach ihrem Auftreten ganz denen des Actinomyces griseus ähnlich; nach einigen Tagen färben sie sich gelb. Die Farbe des Luftmycels entspricht der No. 173—174 des Farbenkodex.

Auf Glukoseagar, sowie auf Ca-Malatglukose haben die Kolonien zuerst kein Luftmycel, das erst nach 5—6 Tagen auftritt; mit 0,1—0,2 Proz. Asparagin haben aber auch die jungen Kolonien ein weißes Luftmycel, desgleichen auf Stärkeagar.

Auf Pepton- und Bouillonagar sind die Kolonien gelblich, mit gut entwickeltem, weißem Luftmycel.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien gelblich; das Luftmycel ist grau.

Auf Bouillongelatine sind die Kolonien gelblich und haben auf der Oberfläche konzentrisch angeordnete Streifen. Die Gelatine wird stark verflüssigt.

In Glukoselösung ist sein Wachstum sehr dem von Actinomyces griseus ähnlich.

Die Luftsporen sind oval, 1,2 μ groß.

Diese Art wächst gut auf Zellulose, ist schwach diastatisch, spaltet Aeskulin, reduziert Nitrate stark und bildet starke proteolytische Enzyme.

Actinomyces viridochromogenes. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar sind die mittelgroßen Kolonien dunkelgrün, der No. 290 des Farbenkodex entsprechend. Das Luftmycel ist weiß, da aber die Farbe der Kolonie durch das Luftmycel hindurchscheint, bekommt letzteres eine blaugrüne, der No. 371 des Farbenkodex entsprechende Farbe.

Auf Glukose- und Stärkeagar sind die Kolonien schwach gefärbt. In den ersten Tagen sind die Kolonien grau, frei von Luftmycel; ihre Oberfläche ist radial gerippt. Später verändert sich die graue Farbe in die schwarze; es erscheint nach 4—5 Tagen ein weißes Luftmycel, das später eine grüne Farbe bekommt.

Auf Bouillon- und Peptonagar sind die Kolonien grau, ohne Luftmycel. Ein braunes Pigment färbt den Nährboden.

Bouillongelatine wird durch graue Kolonien verflüssigt und durch braunes Pigment gefärbt.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien grau, das Luftmycel weiß; Kartoffeln werden schwarz gefärbt.

In der Glukoselösung sind die untergetauchten Kolonien halbkugelig; später erscheinen große Oberflächenkolonien ohne Luftmycel.

Die Luftsporen sind oval, 1,2 μ lang.

Auf Zellulose habe ich kein Wachstum gesehen. Diese Art ist schwach diastatisch, reduziert Nitrate stark, bildet ein braunes Pigment auf eiweißhaltigen Nährböden, scheidet Tyrosinase ab, bildet Chinon. Sie ist nicht oder nur schwach proteolytisch.

Actinomyces flavochromogenes (Actinomyces chromogenes Gasperini). Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar bildet diese Art schöne, gelbe, der No. 156 des Farbenkodex entsprechende Kolonien. Sehr lange bleiben die Kolonien frei von Luftmycel; später bildet sich weißes.

Auf Glukoseagar mit 0,05—0,2 Proz. einer Stickstoffquelle (KNO_3, Asparagin, Pepton) erscheint das Luftmycel auch nicht früher, als nach 6—7 Tagen. Die Farbe des Luftmycels ist grau, die Kolonien haben eine gelbe, der No. 166 des Farbenkodex entsprechende Farbe. Erhält der Nährboden Pepton, so bildet sich ein braunes, den Nährboden färbendes Pigment.

Auf Stärkeagar ist die Farbe der Kolonien die gleiche, wie auf Glukoseagar; das Luftmycel erscheint schon in den ersten Tagen als ein weißer Ring; später bedeckt sich die ganze Oberfläche der Kolonien mit Luftmycel von grauer Farbe.

Auf Bouillon und Peptonagar wird ein graues Pigment ausgeschieden. Das Luftmycel erscheint sehr spät, ungefähr nach 1 Monat, zuerst ist es weiß, später grau.

Auf Bouillongelatine wird braunes Pigment gebildet. Gelatine wird durch die gelblichen Kolonien in den ersten Tagen ein wenig verflüssigt, später erstarrt sie wieder und wird fest.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien gelb; das Luftmycel ist weiß; Kartoffel wird schwarz gefärbt.

In Glukoselösung, sowie in Stärkeflüssigkeit ist das Wachstum kümmerlich. Es bildet sich ein feinflockiger Niederschlag; die Lösung färbt sich in alten Kulturen gelblich.

In Bouillon sitzen die kleinkugeligen Kolonien am Boden und an den Wandungen des Gefäßes; das Wachstum ist recht kräftig, Bouillon färbt sich braun.

Die Luftsporen sind oval, 1,7 μ groß.

Auf Zellulose wächst diese Art später, als die früher beschriebenen; das Wachstum ist kümmerlich, ihre diastatische Wirkung schwach; sie bildet Invertase; Aeskulin wird von ihr gespalten. Sie reduziert stark Nitrate, bildet Tyrosinase und Chinon und auf eiweißhaltigen Nährböden ein braunes Pigment; ihre proteolytische Wirkung ist schwach.

Actinomyces flavus. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar sind die Kolonien zuerst ungefärbt, nach 2—3 Tagen erscheint die gelbe Kolonienfarbe, die der No. 156 des Farbenkodex entspricht. Das graue Luftmycel tritt am 3.—4. Tage auf.

Auf Glukose- und Stärkeagar erhält die Kolonie die gelbe, der No. 171 entsprechende Farbe. Die Farbe des Luftmycels variiert von weiß bis grau. Die Veränderung der Farbe und des Auftretens des Luftmycels mit der Stickstoffquantität des Nährbodens folgt der allgemeinen Regel.

Auf Pepton- und Bouillonagar tritt das Luftmycel erst spät als kreidiger Belag auf.

Auf Bouillongelatine sind die Kolonien gelb, Gelatine wird verflüssigt.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien gelb, das Luftmycel ist grau.

In Glukoselösung sind die Kolonien flockig, denen des Actinomyces flavochromogenes ähnlich.

Die Luftsporen sind oval, 1,2 μ groß.

Auf Zellulose wächst diese Art kümmerlich, ein wenig kräftiger als Actinomyces flavochromogenes; sie ist diastatisch, spaltet Aeskulin und oxydiert Ca-Chinat.

Sie reduziert Nitrate nicht; ihre proteolytische Wirkung ist stark.

Actinomyces parvus. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar sind die einkeimigen Kolonien klein (0,5—1,5 mm groß). Die Strichkulturen stellen kleinkörnige, gelbe Kolonien mit hellgelbem Luftmycel dar.

Die Farbe der Kolonien entspricht den No. 161—166 des Farbenkodex. Das Luftmycel bildet sich am 4.—5. Tage nach dem Auftreten der Kolonie.

Auf Glukose- und Stärkeagar entspricht die Farbe der Kolonien der No. 171 des Farbenkodex. Das Luftmycel ist hellgelb; wird das Stickstoffquantum des Nährbodens erhöht, so erscheint es später.

Auf Bouillon- und Peptonagar sind die einzelnen Kolonien ein wenig größer, als auf den übrigen Nährmedien, das Luftmycel erscheint nur auf 1 Monat alten Kulturen.

Auf Bouillongelatine sind die Kolonien flach, ihre Oberflächen konkav, mit gewölbter Erhebung im Zentrum; die Farbe der Kolonien ist gelb. Gelatine wird langsam verflüssigt.

Auf Kartoffeln ist die Kolonie gelb, das Luftmycel weiß.

In Glukoselösung liegen die Kolonien am Gefäßboden, sind halbkugelig; ihr Durchmesser beträgt ungefähr 0,75—1,5 mm.

Die Luftsporen sind mehr oder weniger oval, 1,6 μ groß.

Auf Zellulose wächst diese Art kümmerlich als weißer Belag. Sie bildet Diastase, reduziert Nitrate schwach, absorbiert die Stickstoffverbindungen der Lösung schnell; ihre proteolyptische Wirkung ist stark.

Actinomyces microflavus. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malatagar sind seine einkeimigen Kolonien sehr klein, die Strichkolonien feinkörnig. Sie sind gelb, der No. 153 des Farbenkodex entsprechend. Auf diesem Nährboden bildet sich kein Luftmycel.

Auf Glukose- und Stärkeagar haben die Kolonien denselben Charakter, wie auf Ca-Malatagar, aber nach 12—14 Tagen bedecken sie sich mit einem gelb-rosa Luftmycel, das besonders schön auf Nährböden mit 0,05—0,2 Proz. Pepton ausgebildet ist.

Auf Bouillon- und Peptonagar sind die Kolonien gelb, das Luftmycel bildet sich auf 3—4 Wochen alten Kulturen; es ist gelb-rosa.

Auf Bouillongelatine sind die Kolonien gelb und klein; Gelatine wird verflüssigt.

Auf Kartoffeln ist der Charakter der Kolonien ganz von dem allgemeinen Charakter der Aktinomycetenkolonien verschieden. Es bildet sich eine gelbe, schmierige Masse ohne Luftmycel.

In Glukoselösung sind die Kolonien kleinkugelig; Oberflächenkolonien werden nicht gebildet.

Die Luftsporen sind groß, bacillen- oder kokkenähnlich, oft paarweise oder in Ketten vereinigt, 2 μ dick, 2—5 μ lang.

Auf Zellulose ist sein Wachstum kümmerlich; er bildet auf Filtrierpapier einen weißen Belag. Diese Art gehört zu den stärksten Diastasebildnern; sie reduziert die Nitrate und bildet starke, proteolytische Enzyme.

Actinomyces ruber. Aus Gartenerde isoliert.

Auf Ca-Malat-, Glukose- und Stärkeagar bildet Actinomyces ruber orangerote, 0,5—1 mm große Kolonien. Die Farbe entspricht der No. 86 oder 81 des Farbenkodex. Bei dem gewöhnlichen Stickstoffquantum bildet sich ein dunkelrotes Luftmycel, das den Gipfel der konisch sich erhebenden Kolonien bedeckt, was besonders gut auf Ca-Malatagar sichtbar ist, nicht aber auf Glukoseagar, wo die Oberfläche der Kolonien flach ist.

Auf Agarnährböden mit großen Stickstoffmengen entspricht die Farbe der Kolonien der No. 106 des Farbenkodex; das Luftmycel ist schwach ausgebildet.

Auf Bouillon- und Peptonagar wird kein Luftmycel gebildet; die Farbe entspricht der No. 136.

Die Agarkolonien dieser Art sind hart; die Überimpfung muß mit großer Sorgfältigkeit gemacht werden.

Auf Bouillongelatine wächst diese Art sehr schwach oder gar nicht; wird aber eine Kolonie, die sehr klein ist, gebildet, so verflüssigt sie die Gelatine sehr schnell; es bildet sich ein trichterähnliches Rohr, in dem die Kolonie sitzt.

Auf Kartoffeln konnte ich kein Wachstum erhalten.

In Glukoselösung bilden sich kleine, rote, kugelige Kolonien (0,5—1 mm groß), die auf dem Boden des Gefäßes liegen.

Die Luftsporen sind genau kugelig, 1 μ groß.

Diese Art wächst auf Zellulose, wo sie einen roten Flecken bildet, ist schwach diastatisch, reduziert Nitrate und bildet starkwirkende, proteolytische Enzyme.

Actinomyces melanosporeus. Aus Gartenerde isoliert.

Digitized by Google Original from UNIVERSITY OF CALIFORNIA

Auf Ca-Malat-, Glukose- und Stärkeagar haben die Kolonien eine orangerote Farbe (No. 111 des Farbenkodex); 3—5 Tage nach dem Auftreten der Kolonien bedeckt sich ihre Oberfläche mit glänzendem, schwarzen Luftmycel. Bei Erhöhung der Stickstoffquantität des Agarnährbodens wird das Luftmycel ein wenig später gebildet, aber die Farbe desselben bleibt unverändert.

Auf Bouillon- und Peptonagar entspricht die Farbe der Kolonien der No. 102; Luftmycel wird nicht gebildet.

Auf Bouillongelatine bilden sich kleine, rötliche Kolonien ohne Luftmycel, die die Gelatine verflüssigen.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien rot, das Luftmycel ist schwarz.

In Glukoselösung liegen die flockigen, orangegelben Kolonien frei auf dem Gefäßboden.

Die Luftsporen sind genau kugelig, 1.2 μ groß.

Die Art wächst kräftig auf Zellulose, aber ihr Wachstum beginnt etwas später, als das der Arten der Macrogruppe. Auf Filtrierpapier bildet sie rote Flecken; später erscheint ein schwarzes Luftmycel, das konzentrische Kreise bildet. Das Papier wird stark zersetzt. Sie ist schwach diastatisch, reduziert Nitrate stark und bildet proteolytische Enzyme.

Actinomyces melanocyclus. E. Maerker hat eine Mikrobenart beschrieben, den Micrococcus melanocyclus, die auf Zellulose konzentrische Kreise bildete und die Zellulose nicht vollständig zersetzte. Wird eine Filtrierpapierplatte mit Gartenerde infiziert, so erhalten wir bei 30° neben den ferrugineus-Flecken konzentrische, schwarze Kreise. Mit einem Ausstrich auf Ca-Malatagar erhalten wir diese Art, die auch auf mit Gartenerde oder mit Kanalwasseralgen infizierten Agarplatten wächst.

Auf Ca-Malat-, Glukose- und Stärkeagar sind seine Kolonien klein, orangerot (No. 111 des Farbenkodex). Die Kolonie ist flach, wächst nach den Seiten mehr als in die Tiefe. Das Luftmycel erscheint auf den Rändern als schwarzer, wenig bemerkbarer Ring, der sich erst spät entwickelt. Bald treten schwachrote, die zentrale Kolonie umfassende Kolonien auf, die später den schwarzen Luftmycelring bilden. Wird das Stickstoffquantum erhöht, so bildet sich das Luftmycel immer später.

Auf Bouillongelatine ist das Wachstum ebenso, wie bei Actinomyces ruber, schlecht, die Verflüssigung aber stark.

In Glukoselösung sind die Kolonien ungefärbt und kugelig.

Die Luftsporen sind genau kugelig, 0,9 μ groß.

Ebenso wie Actinomyces melanosporeus ist diese Art eine stark zellulosezersetzende, die auf Papier schwarze Kreise bildet und das Papier verdünnt. Sie ist diastatisch, reduziert Nitrate und bildet stark wirkende, proteolytische Enzyme.

Actinomyces albosporeus. Aus Gartenerde und Dünensand isoliert.

Auf Ca-Malat-, Glukose- und Stärkeagar sind seine kleinen Kolonien orangerot (No. 126 des Farbenkodex), mit weißem Luftmycel bedeckt. Später färbt sich auch das Luftmycel gelb (No. 121 des Farbenkodex). Wird das Stickstoffquantum erhöht, so wird die Farbe der Kolonien hell (No. 80 des Farbenkodex). Das Luftmycel ist kräftig und bildet sich ebenso gut auf stickstoffarmen, wie auf stickstoffreichen Nährböden, sowie auf Bouillon- und Peptonagar, wo die Farbe der Kolonie der No. 141 des Farbenkodex entspricht.

Auf Bouillongelatine ist sein Wachstum kräftig; Gelatine wird verflüssigt.

Auf Kartoffeln sind die Kolonien rot; das Luftmycel ist weiß.

In Glukoselösung bildet die grobflockige, untergetauchte, mit einer Haut bedeckte Oberflächenkolonien mit weißem Luftmycel.

Die Luftsporen sind genau kugelig, 0,7 μ groß.

Die Art ist diastatisch, reduziert stark Nitrate, ihre proteolytische Wirkung ist stark.

Dem Herrn Professor M. W. Beijerinck drücke ich meinen innigen Dank aus für die gebotene Möglichkeit, in seinem Laboratorium zu arbeiten und seine wertvollen Ratschläge zu benutzen.

Tafelerklärung.

Tafel 1.

Kolonien in flüssigem Nährboden (Leitungswasser, 1 Proz. Glukose, 0,05 NH_4NO_3, 0,05 Proz. K_2HPO_4).

Fig. 1. Actinomyces diastaticus (Typus 1). Bodensatz.

Fig. 2. Actinomyces parvus (Typus 1). Bodensatz.

Fig. 3. Actinomyces griseus (Typus 2). Bodensatz und Oberflächenkolonien.

Fig. 4. Actinomyces cellulosae (Typus 3). Bodensatz und runde Oberflächenkolonien.

Tafel 2.

Fig. 1. Eine Woche alte Agarplatten-Kulturen (1 Proz. Glukose, 0,05 Proz. Aspragin, 0,05 Proz. K_2HPO_4) a — Actinomyces flavochromogenes, b — Ac. flavus, c — Ac. parvus, d — Ac. microflavus, e — Ac. ruber. Bei allen war das Luftmycel noch nicht gebildet.

Fig. 2. Eine Woche alte Agarplatten-Kulturen (1 Proz. Glukose, 0,2 Proz. Asparagin, 0,05 Proz. K_2HPO_4). a — Actinomyces viridochromogenes (mit Luftmycel), b — Ac. albosporeus (mit Luftmycel), c — und d — Ac. ruber (kein Luftmycel), e — Ac. melanosporeus (schwarzes Lultmycel).

Fig. 3. 5 Tage alte Agarplatten-Kulturen (1 Proz. Glukose, 0,05 Proz. Asparagin, 0,05 Proz. K_2HPO_4) a — Actinomyces erythrochromogenes, b — Ac. griseus, c — Ac. diastaticus, d — Ac. roseus, e — Ac. cellulose. Alle mit Luftmycel.

Fig. 4. 10 Tage alte Agarplatten-Kulturen (1 Proz. Glukose, 0,5 Proz. Asparagin, 0,05 Proz. K_2HPO_4) a — Actinomyces albur, b — Ac. diastatochromogenes, c — Ac. griseoflavus (kein Luftmycel), d — Ac. ruber (kein Luftmycel), e — Ac. citreus, f — Ac. albosporeus (kein Luftmycel).

Inhalt.

Original-Abhandlungen.

Grimm, Max, Flüchtige organische Verbindungen als einzige Kohlenstoffquellen, p. 647.

Krainsky, A., Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur, p. 649.

Ruzicka, Vlad., Kausal-analytische Versuche über den Ursprung des Chromatins der Sporen und vegetativen Individuen der Bakterien, p. 641.

Die Herren Mitarbeiter werden höflichst gebeten, bereits fertiggestellte Klischees — falls solche mit den Manuskripten abgeliefert werden — nicht der Redaktion, sondern direkt der Verlagsbuchhandlung Gustav Fischer in Jena einzusenden.

Abgeschlossen am 22. Juli 1914.

Hofbuchdruckerei Rudolstadt.

Centralblatt für Bakteriologie Abt. II. Bd. 41. ***A. Krainsky,*** *Aktinomyceten* **Taf. I.**

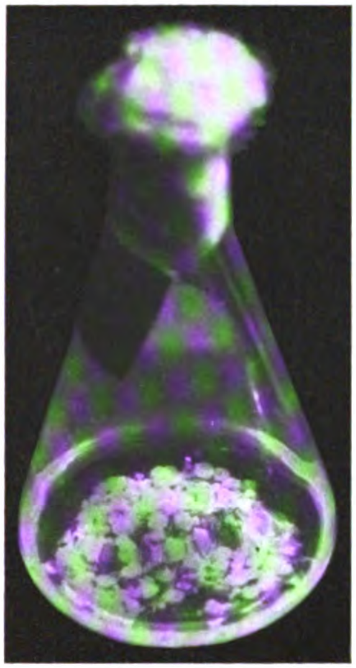


Fig. 1.

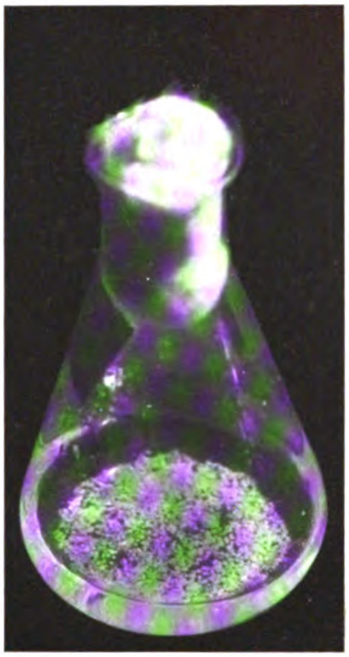


Fig. 2.

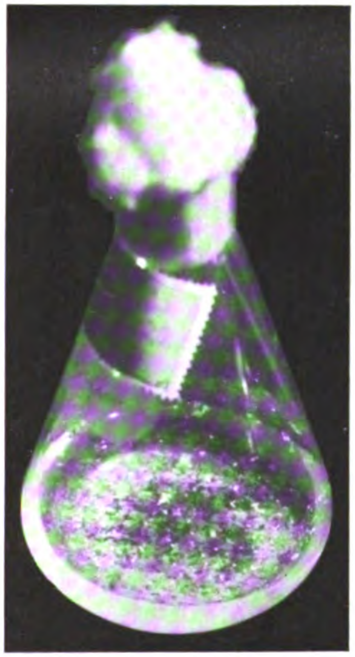


Fig. 3.

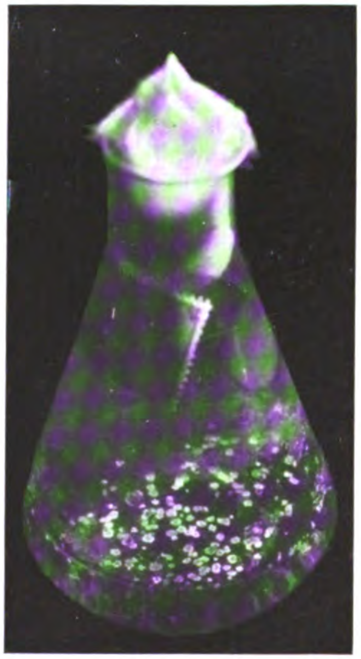
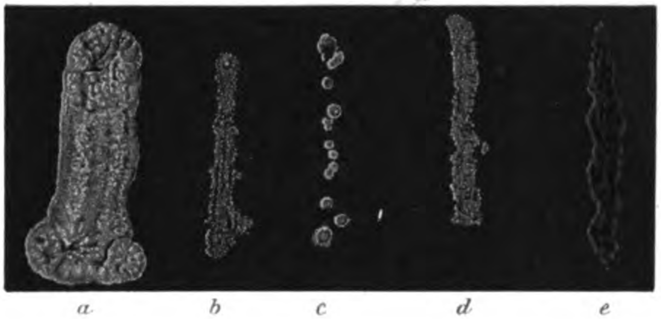


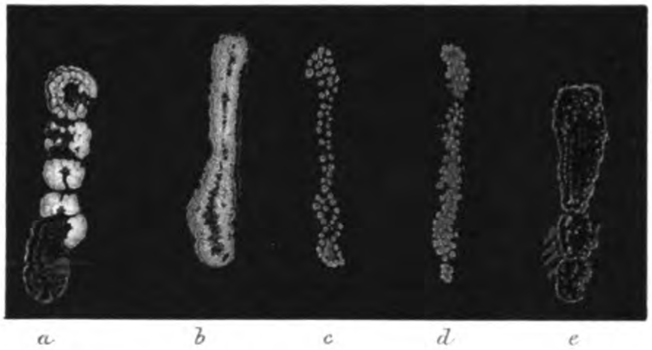
Fig. 4.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

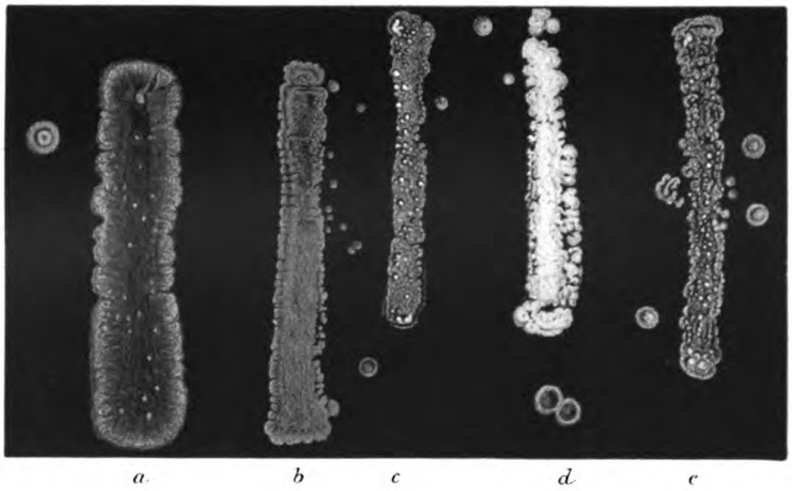
1.



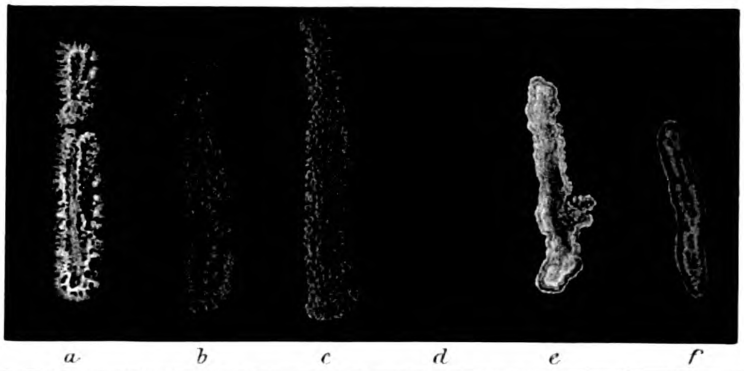
2.



3.



4.



Krainsky

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Lith. Anst. F. Weise, Jena

Centralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 41. No. 26.
Ausgegeben am 12. September 1914.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 41 enthaltenen Arbeiten.

Andrewes, F. W., The cytology and bacteriology of condensed milks. 266
Anonym, Einseitig geblähter Käse. 274
—, Milch euterkranker Kühe. 268
—, Ziegenmilch als Kinder- und Krankenmilch. 267
Aumann u. **Storp,** Über die Sterilisation kleiner Trinkwassermengen durch Chlorkalk, mit Berücksichtigung der militärischen Verhältnisse. 313
Auzinger, A., Die Alkoholreaktion der Milch. 308

Bail, O. u. **Breinl, F.,** Versuche über das seitliche Vordringen von Verunreinigungen im Boden. 278
Beckwith, T. D., Soil inoculation under soil conditions of lime deficiency. 284
Beijerinck, M. W., Über das Eindringen von Methylenblau in lebende Zellen nach dem Eintrocknen [Over het indringen van methyleenblauw in levende cellen na indroging]. 302
—, Über die Zusammensetzung der Tyrosinase aus zwei Enzymen. [Over de samestelling der tyrosinase uit twee enzymen.] 248
Belonovsky, G. D., Sur la prolongation de la vitalité du Bacille bulgare. 270
Bericht über die an der landw. Landes-Lehranstalt S. Michele im Jahre 1913 durchgeführten Versuche mit Pflanzenschutzmitteln. 239
Bernard, Ch. s. **Ernst, A.**
Bode, G. s. **Henneberg, W.**
Böeseken, J. u. **Waterman, H. J.,** Eine biochemische Bereitungsart von L-Weinsteinsäure. [Eene biochemische bereidingswijze van l-Wijnsteenzuur.] 297
Bokorny, Fr., Bindungsvermögen lebender Hefe für Ammoniak, geringe Beteiligung wasserlöslicher Säuren. 252
Bornemann, In welchem Maße tragen Stallmist und Gründüngung durch Lieferung von Kohlensäure zum Ernteertrag bei? 290
Bothe s. **Seelhorst, von.**
Breinl, F. s. **Bail, O.**
Brillan, W. s. **Kostytschew, S.**
Brown, Charles W., Action of a few common butter organisms upon casein. 272
Brown, P. E., A new method for the bacteriological examination of soils. 312
Brüne, Fr. s. **Tacke, Br.**
Buchta, Ludwig, Über den Einfluß des Lichtes auf die Sprossung der Hefe. (Orig.) 340
Burgess, P. S. s. **Lipman, C. B.**
Burri, R., Über die Beziehungen gewisser Schimmelpilze des Bodens zu den benzoësauren Salzen und anderen aromatischen Körpern der Gülle. 295
— u. **Kürsteiner, J.,** Studien über die zweckmäßigste Käsereilabbereitung, I. Teil: Der Einfluß des Kasols auf den Säuregrad des Labes. 273
Bussmann, Erich, Einige Versuche über den Einfluß von Phonolith und Kalktraß auf das Stickstoffsammlungsvermögen von Ackererden. 291

Cayla, V., Les taches du Caoutchouc de plantation. 297
Clinton, G. P., Report of the station botanist. 240

Desroche, P. s. **Matruchot, L.**
Detre, L., Die Milch als Trägerin von Infektionen. 268
Doane, C. F., The action of Bacillus bulgaricus in supressing gassy fermentations in cheese making. 272
Drews, R., Die Milchversorgung großer Städte mit spezieller Berücksichtigung der Verhältnisse in Hamburg. 264

Edwards, S. F., Notes on yeast-like organisms in whey. 272
Ehrenberg, Paul, Zur Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau. 279
Ehrlich, Felix, Neuere Untersuchungen über die Vorgänge beim Eiweißstoffwechsel der Hefe- und Schimmelpilze. 251
—, Über einige chemische Reaktionen der Mikroorganismen und ihre Bedeutung für chemische und biologische Probleme. 245
Ernst, A. u. **Bernard, Ch.,** Beiträge zur Kenntnis der Saprophyten Javas. 300
— u. **Schmid, E.,** Über Blüte und Frucht von Rafflesia. 300

Fawcett, Edna H. s. **Kellerman, Karl F.**
Fettick, Otto, Butter mit Stallgeruch und bitterem Geschmack. 275
—, Schleimige Milch, durch den Bac. mesentericus hervorgerufen. 263
Ficker, M., Zur bakteriologischen Wasseruntersuchung. 303
Fischer, H., Die Bakterienimpfung zu Leguminosen. 286
Fred, Erwin Brown, The use of stains in the study of bacteria. 302
Frei, W., Versuche über Kombination von Desinfektionsmitteln. 237
Fresenius s. **Lemmermann.**
Freund, W., Das Biorisatorverfahren nach Dr. Lobeck. 305
Friedel, K., Besteht ein Zusammenhang zwischen Sammelmolkereien und einer angeblichen Unterernährung und der Säuglingssterblichkeit auf dem Lande? 267
Fuller, J. W. s. **Larsen, C.**

Gabathuler, A., Ein Beitrag für Yoghurtkontrolle. 270
Grafe, V. u. Vouk, V., Das Verhalten einiger Saccharomyceten (Hefen) zu Inulin. 252
Gratz, O. u. Vas, K., Die Mikroflora des Liptauer Käses und ihre Rolle beim Reifen und Scharfwerden desselben. (Orig.) 481
Greaves, J. E., A study of the bacterial activities of virgin and cultivated soils. (Orig.) 444
Green, H. H., Investigations into the nitrogen metabolism of soil. (Orig.) 577
Grignan, L'inoculation de bactéries nitrifiantes dans le sol. 286
Grimm, Max, Flüchtige organische Verbindungen als einzige Kohlenstoffquellen. (Orig.) 647
Grimmer, W., Beiträge zur Kenntnis der Fermente der Milchdrüse und der Milch. 246
Grimmer, Über den Wert der biologischen Milchuntersuchungsmethoden. 307

Haas s. **Seelhorst, von.**
Hanzawa, J., Einige Beobachtungen über Stickstoffbindung durch Azotobacter in stickstoffarmen und in stickstoffreichen Substraten. (Orig.) 573
Harding, H. A., Ruehle, G. L., Wilson, J. K. and **Smith, G. A.,** The effect of certain dairy operations upon the germ content of milk. 263
Hayata, B., Über die systematische Stellung von Mitrastemon, als einer neuen Gattung und besonderen Tribus der Rafflesiaceen. 301
Heinze, B., Einige weitere Beiträge zur Kultur der Leguminosen mit besonderer Berücksichtigung der Stickstoffernährung. 285
Henneberg, W. u. Bode, G., Die Gärungsgewerbe und ihre naturwissenschaftlichen Grundlagen. 250
Herrmann, F., Jahresbericht der zoologischen Versuchsstation. 238
Herzfeld, Welche Erfahrungen liegen für die Einmietung der Schnitzel unter Impfung mit Lacto-Pülpe vor? 298
Hewlett, R. T., Villar, S. u. Revis, C., On the nature of the cellular elements present in milk. Part IV. The histological appearances of the udder. 263
Hillard, C. M. s. **Stowell, E. C.**
Huyge, C., Index bibliographique des travaux parus sur le lait et les produits laitiers pendant l'année 1912. 262

Jancsó, Béla, Chlornatrium als Düngemittel für Zuckerrüben. 290
Jones, Dan. H., A cultural and morphological study of some Azotobacter. 278

Kappen, H., Die Katalyse des Cyanamids und ihre Bedeutung für die Landwirtschaft. 283
—, Die katalytische Kraft des Ackerbodens. 282
Kaserer, H., Versuche über Bodenmüdigkeit. 276
Kellerman, Karl F. and **Fawcett, Edna H.,** Studies of the B. subtilis group. 300
Kern, H. u. Müller, E., Über eine vereinfachte Herstellung der Eiweißmilch. 306
Ketel, B. A. van, Bacillus coli in der Milch. 269
Kita, G., Einige japanische Schimmelpilze. II. Mitteilung. Über die Aspergillusarten aus „Katsuobushi" und Vergleichung von vier A. ochraceusartigen Pilzen. (Orig.) 351
—, Japanische Sojaindustrie. 257
—, Über die Asporogenität der Sojahefen. (Orig.) 364
Klaeser, M., Die Reduktion von Nitraten zu Nitriten und Ammoniak durch Bakterien. (Orig.) 365
Kleinböhl, H., Gervaiskäse. 273
Kleine, R., Die Kümmelmotte Schistodepressaria nervosa Hw. Ein Beitrag zu ihrer Biologie und ihrer Bedeutung für die Landwirtschaft. 232
Kluyver, A. J., Assimilierbarkeit der Maltose durch Hefen. 252
Koch, Alfred, Ergebnisse zehnjähriger vergleichender Feldversuche über die Wirkung von Brache, Stalldünger und Klee. 291
—, Über die Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes auf den Boden und die ihn bewohnenden Pflanzen. (Orig.) 545

Kostytschew, S., Brillant, W. u. Scheloumoff, Über die Atmung lebender und getöteter Weizenkeime. 248
— u. **Scheloumoff, A.,** Über Alkoholbildung durch Weizenkeime. 253
Krainsky, A., Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. (Orig.) 649
—, Zur Frage der Zellulosezersetzung durch Mikroorganismen. 296
Kühl, H., Der desinfektorische Wert des reinen und des Quecksilbercyanid haltenden Quecksilberoxycyanids. 233
Kürsteiner, J. s. **Burri, R.**

Lafar, Handbuch der Technischen Mykologie. 242
Lang, Le Roy, A method for the improvement of buttermilk from pasteurized cream. 275
Larsen, C., White, Wm. and **Fuller, J. W.,** Preliminary report on the milking machine. 308
Laxa, O., Über die Bedeutung der Wiesen und Weiden für die Milchwirtschaft. 268
Legendre, R., Simple tour de main pour obtenir une chambre humide microscopique. 302
Lemmermann u. **Fresenius,** Beitrag zur Frage der Ammoniakverdunstung aus Böden. 280
Lemmermann, O. u. **Wichers, Jhr. L.,** Verlauf der Denitrifikation in Böden bei verschiedenem Wassergehalt. (Orig.) 608
Liechti, Paul, Über die Wirkung des Schwefels auf das Pflanzenwachstum. 295
Lipman, C. B. and **Burgess, P. S.,** Antagonism between anions as affecting soil bacteria. II. Nitrification. (Orig.) 430
Löhnis, F., Die Titration der Milch mit Alkohol von verschiedener Konzentration. 309
—, Untersuchungen über den Keimgehalt der in Leipzig im Handel befindlichen Milchsorten. 261
—, Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie. 241
—, Zur Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau. 632
Lüstner, G., Bericht über die Tätigkeit der pflanzenpathologischen Versuchsstation. 638
Lundberg, J., Einwirkung des Cyklamins auf die alkoholische Gärung. 253
Lvoff, S. s. a. **Palladin, W.**
—, Hefegärung und Wasserstoff. 254

Marcas, L., Moyens rapides de contrôle de la pureté de la fermentation lactique. 304
Matruchot, L. et **Desroche, P.,** Sur la végétation sulfureuse de la Pièce d'eau des Suisses à Versailles. 258
Mayer, s. **Seelhorst, von.**
Mazé, P., L'Affinage des fromages moisis et les ferments qui y président. 274
McBeth, J. G. s. **Scales, F. M.**
McDermott, F. A., On some chemical activities of Citromyces: Utilization of nitrogenous substances, and effects of heavy metals in the medium. 297
Meißner, R., Über die Bildung flüchtiger Säure in zuckerfreien Weinen und Nährlösungen bei Luftzutritt durch reingezüchtete Weinhefen. 255
Mielck, Otfried, Die Wirkungen der Gründüngung. 286
Molisch, H., Mikrochemie der Pflanze. 301
Molz, E. s. **Müller, H. C.**
Morgenthaler, O. s. **Müller, H. C.**
Morres, W., Warum ist die Alizarolprobe wertvoller als die Alkoholprobe? 310
Müller, E. s. **Kern, H.**
Müller, H. C., Molz, E. u. **Morgenthaler, O.,** Über Brandbekämpfung und den Einfluß der Bestellzeit beim Sommerweizen auf dessen Ertrag und Gesundheit. 637
Müther s. **Seelhorst, von.**
Muth, Fr., Über den Einfluß des Frostes auf die Zusammensetzung des Mostes und Weines der Trauben. 255

Naumann, A., Die neuerbaute Station für gärtnerischen Pflanzenschutz am Königl. botanischen Garten zu Dresden. 240
Northrup, Zae, A bacterial disease of the larvae of the june beetle, Lachnosterna spp. (Orig.) 321

Ohlmer s. **Seelhorst, von.**

Palladin, W. u. **Lvoff, S.,** Über die Einwirkung der Atmungschromogene auf die alkoholische Gärung. 249
Paris, G., Contributo sperimentale allo studio die Saccaromiceti. 250
Perfiliev, B., Ein Schlammsauger zur Gewinnung der Bodenmikroflora und -fauna. 312
Perotti, R., Sopra la microflora delle Campagna romana. 275
Petit, P., La question de l'eau. 256
Pringsheim, Hans, Die Beziehung der Zellulosezersetzung zum Stickstoffhaushalt in der Natur. II. 295

Rahn, Otto, Bacterial activity in soil as a function on the various physical soil properties. 276
Ramm, Zur Frage der Impfung bei Neukulturen auf Hochmoor. 285
Rasquin, M., Les fraudes du lait. 268
—, Le lait et les microbes. 264
Reuter, O. M., Lebensgewohnheiten und Instinkte der Insekten bis zum Erwachen der sozialen Instinkte. 633
Revis, C. s. **Hewlett, R. T.**

Riffart, H. s. **Tillmans, J.**
Rostworowski, Graf s. **Seelhorst, von.**
Rubner, Über Hefeforschung. 250
Ruehle, G. L. s. **Harding, H. A.**
Ruzicka, Vlad., Kausal-analytische Versuche über den Ursprung des Chromatins der Sporen und vegetativen Individuen der Bakterien. (Orig.) 641

Scales, F. M., McBeth, J. G. and **Smith, N. R.,** Characteristics of cellulose-destroying bacteria. 296
Scheloumoff s. **Kostytschew, S.**
Schepotieff, A., Untersuchungen über niedere Organismen. IV. Studien über Meeresbakterien. 258
Schlesinger, M. J. s. **Stowell, E. C.**
Schliephacke, Einsäuern und Futterwert von Rohkartoffeln und Stoppelklee. 298
Schmid, E. s. **Ernst, A.**
Schroeder, Harold, The bacterial content of coal. (Orig.) 460
Schulz, Konrad, Die Verbreitung der Bakterien im Waldboden. 277
Schwarz, Yoghurt. 270
Seelhorst, von, Die Wasserbilanz und die Nährstoffverluste eines gebrachten Lehm- und Sandbodens in den Jahren 1905—1912. 293
—, unter Mitwirkung von **Müther, Mayer, Bothe, Haas, Ohlmer, Graf Rostworowski** u. **Sinz,** Der Verbleib des Gründüngungsstickstoffs im Sandboden auf Grund von Vegetationsversuchen. 287
Sherman, J. M., The number and growth of protozoa in soil. (Orig.) 625
Simon, Josef, Über die Verwandtschaftsverhältnisse der Leguminosen-Wurzelbakterien. (Orig.-Ber.) 470
Sinz s. **Seelhorst, von.**
Skar, Olaf, Verhalten der Leukocyten der Milch bei der Methylenblaureduktaseprobe. 305
De Smet, La composition de la bière et sa stabilité. 256
Smirnow, M. R., The value of glycerinated potato as a culture medium. 303
Smit, Jan, Bakteriologische und chemische Untersuchungen über die Milchsäuregärung. (Bacteriologische en chemische onderzoekingen over de melkzuurgisting). 259
Smith, G. A. s. **Harding, H. A.**
Smith, N. R. s. **Scales, F. M.**
Spieckermann, Bemerkungen zur Bekämpfung des Kartoffelkrebses. 636
Splittgerber, A. s. **Tillmans, J.**
Staub, W., Weitere Untersuchungen über die im fermentierenden Tee sich vorfindenden Mikroorganismen. 298
Steffenhagen, K., Über die Behandlung des Trinkwassers mit Chlorkalk. 635
Steinegger, R., Förderung der Lochbildung im Emmentalerkäse. 275
Storp s. **Aumann.**
Stowell, E. C., Hillard, C. M. and **Schlesinger, M. J.,** A biometric study of Streptococci from milk and from the human throat. 264
Stuchlik, Jar., Serologie in der Botanik. 302
Sullivan, M. H., The origin of certain organic soil constituents. 276

Tacke, Br. u. **Brüne, Fr.,** Vergleichende Düngungsversuche mit Kalkstickstoff, Stickstoffkalk, Chilesalpeter und schwefelsaurem Ammoniak auf Sand- und Hochmoorböden. 294
Takahashi u. **Yukawa,** Die Pilze von „Shoju-Moromi“. 257
Theißen, F., Über Membranstrukturen bei den Mikrothyriaceen als Grundlage für den Ausbau der Hemisphaeriales. 631
Tillmans, J., Splittgerber, A. u. **Riffart, H.,** Über Bestimmung und Bedeutung des Ammoniakgehaltes der Milch. 311
Tubeuf, C. von, Pflanzenpathologische Bilder und Notizen aus den nordamerikanischen Wäldern. I. Caeoma an Pseudotsuga douglasii und Uredo an Chamaecyparis nutkaensis. 480
Tymstra, B. S., Tabaks fermentatie. 297

Vas, K. s. **Gratz, O.**
Villar, S. s. **Hewlett, R. T.**
Vogel, J., Bemerkung zu meinen Beobachtungen über das Verhalten von Nitrat im Ackerboden. 281
Vouk, V. s. **Grafe, V.**

Wachtel, Paul, Die Wasserstoffsuperoxydkatalyse durch Boden. 284
Wagener, W., Zur Frage der Ernährung kranker Säuglinge mit Larosanmilch. 269
Waterman, H. J. s. **Böeseken, J.**
Wehmer, C., Holzansteckungsversuche mit Hausschwamm (Merulius lacrymans). 633
White, Wm. s. **Larsen, C.**
Wichers, Jhr. L. s. **Lemmermann, O.**
Wiegner, Georg, Die Festlegung des Stickstoffs durch sogenannte Zeolithe. 281
Wigger, A., Untersuchung über die Bakterienflora einiger Kraftfuttermittel in frischem und gärendem Zustande, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Einwirkung auf Milch. (Orig.) 1
Wilson, J. K. s. **Harding, H. A.**
Wolff, A., Blaue Milch. 267
—, Was ist Yoghurt und Instetibacter und worin besteht deren Wirkung? 271
Wolodarski, G., Untersuchungen über die feinsten Luftstäubchen. 299

Yukawa, s. **Takahashi.**

Zaleski, W., Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenatmung. 248
—, Bemerkungen zu Kostytschews Mitteilungen über die Atmung der Weizenkeime. 250
—, Über die Verbreitung der Karboxylase in den Pflanzen. 247
Zikes, Heinrich, Ein Beitrag zur Enzymbildung und deren Ursachen. 246
—, Einige orientierende Versuche über die Thermogenität verschiedener Hefen in Glukosewürze. 251

II. Namen- und Sachverzeichnis.

Abies pectinata, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
Actinomyces und Bacterium, Bildung von Melanin. 248
—, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— albo-roseus, Zerstörung von Zellulose. 296
— albosporeus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— albus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— cellulosae, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Reinkultur. 658
— chromogenes, Chinonbildung. 655
— —, Farbstoffbildung. 654
— —, Vorkommen im Liptauer-Käse. 513
— citreus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— coelicolor, Reinkultur. 658
— diastaticus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
— —, Reinkultur. 657
— diastatochromogenes, Farbstoffbildung. 662
— erythrochromogenes, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
— flavochromogenes, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— — Nitratreduktion. 676
— flavus, Farbstoffbildung. Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
— griseoflavus. Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— griseus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
— melanocyclus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Zerstörung von Zellulose. 296
— melanosporeus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— microflavus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
Actinomyces odorifer, Erreger des Bodengeruchs. 655
— parvus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
— roseus, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
— —, Nitratreduktion. 676
— ruber, Farbstoffbildung. Bedeutung des Nährbodens. 662
— termophiles, Reinkultur. 658
— viridochromogenes, Farbstoffbildung, Bedeutung des Nährbodens. 662
Aesculin, Bildung durch Aktinomyceten. 671
Äthylacetat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Äthyläther, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Äthylalkohol, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Aktinomyceten, Anhäufungs- und Separationsmethoden. 656
—, Bedeutung in der Natur. 649
—, — für die Zersetzung und Humifizierung von Pflanzenresten. 659
—, Bildung von Aesculin. 671
—, — — Diastase. 671
—, — — Invertase. 671
—, Morphologie. 660
—, Physiologie. 668
—, Reduktion von Nitraten. 673
—, Systematik. 677. 680
—, Vorkommen in verschiedenen Bodenarten. 655. 659
—, — — — Bodentiefen. 659
—, Zellulosezersetzung. 673
Aktinomycetengehalt des Bodens. 655
Alizarolprobe der Milch, Vergleich mit Alkoholprobe. 310
Alkaloide, Stickstoffquelle für Pilze und Hefen. 245
Alkohol, Bildung aus Aminen durch wilde Hefen und Schimmelpilze. 245
—, — durch Weizenkeimlinge. 253
Alkoholgärung s. Gärung, Alkohol.
Alkoholreaktion der Milch, Wert. 308
Allorhina nitida, Larve, Nachweis von Micrococcus nigrofaciens. 332

Ameisensäure, Bildung bei Kleiegärung. 20
Amerika, Auftreten des Junikäfers an verschiedenen Wirtspflanzen. 321
—, Endothia gyrosa var. parasitica heimisch. 240
—, Schädigung von Quercus durch Diaporthe parasitica. 240
—, Vorkommen von Gymnosporangium japonicum auf Juniperus chinensis f. compacta. 240
Amine, Umwandlung durch wilde Hefen und Schimmelpilze in Alkohole. 245
Ammoniak, Bildung im Boden in verschiedenen Monaten. 587
—, — durch Cladothrix chromogenes. 655
—, — in kultiviertem und unbearbeitetem Boden. 449
—, Bindung durch Hefe. 252
—, Nachweis neben Nitrat und Nitrit. 366
—, schwefelsaures, Vergleich mit Kalkstickstoff, Chilisalpeter und Stickstoffkalk. 294
—, Speicherung durch Bakterien. 383
Amsel, natürlicher Feind von Lachnosterna. 322
Amylacetat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Amylalkohol, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Amylase, Vorkommen in Milchdrüsen. 247
Ananas, Schädigung durch Diestrammena marmorata in Gewächshäusern. 239
Anthonomus pomorum, Biologie und Bekämpfung. 239
Anthyllis vulneraria, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Antiparasit, Bekämpfungsmittel gegen Frostspanner. 240
—, — — rote Schildlaus auf Birnbäumen. 239
Apfelbaum, Schädigung durch Orchestes fagi. 640
Apfelmehltau, Bekämpfung mit Schwefelkalkbrühe. 239
Apfelwickler, Bekämpfungsversuche mit Fanggürteln. 239
Arachis, Fett, Ranzigwerden. 92
— hypogaea, Ausbleiben spontaner Knöllchenbildung. 479
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Aspergillus, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
—, Vorkommen in Erdnußmehl. 94
— -Arten von Katsuobushi, Untersuchung. 351
— albus, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
— candidus, diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
— flavo-viridescens, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
— glaucus, Auftreten auf Katsuobushi. 352
— —, diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
Aspergillus glaucus, Wachstum, Temperaturoptimum. 358
— gymnosarda, Auftreten auf Katsuobushi. 351
— melleus, Auftreten auf Katsuobushi. 351
— —, Vergleich mit A. ochraceus und Onikipilz. 359—363
— niger, Verhalten gegenüber Weinsteinsäure. 297
— —, Vorkommen von Karboxylase. 247
— ochraceus, diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
— —, Vergleich mit A. melleus und Onikipilz. 359—363
— —, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
— oryzae, Bedeutung für die Bereitung von Koji. 257
— —, diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
— —, Wachstum, Temperaturoptimum. 358
— repens, Kohlenstoffnahrung aus der Luft. 647
— sulfureus n. var., diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
— — — —, Vorkommen auf Bonit. 353
— — — —, Wachstum, Temperaturoptimum. 358
— tamarii, diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
— wentii, diastatische und proteolytische Enzyme. 354—357
— —, Wachstum, Temperaturoptimum. 358
Atmungschromogene, Wirkung auf die Alkoholgärung. 249
Azotobacter, Stickstoffbindung in stickstoffarmen und -reichen Substraten. 573
—, Untersuchung verschiedener Arten. 279
— chroococcum, Bodenimpfung. 286

Bacillus alvei, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— amylobacter var. immobilis, Vorkommen im Liptauer-Käse. 511
Bacillus anthracis, Vorkommen in Kleie. 80. 83. 84
— asterosporus, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Gasbildung, Wirkung von Nitraten und Nitriten. 423
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Nitritspeicherung. 383
— —, Vorkommen im Liptauer Käse. 505
— atterimus (?), Vorkommen im Liptauer Käse. 507
— bulgaricus, Bedeutung für die Unterdrückung der Gasbildung im Käse. 272
— —, — — — Vernichtung der Fäulnisbakterien im Darm. 271

Bacillus bulgaricus, Fehlen in Yoghurttrockenpräparaten. 270
— —, Lebensdauer, Verlängerung durch Calciumkarbonat. 270
— calidus, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— carotarum, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Nitritspeicherung. 383
— cerasinus n. sp., Vorkommen im Liptauer Käse. 508
— cereus, Aufteilung in verschiedene Spezies. 300
— cirrosus n. sp., Vorkommen im Liptauer Käse. 509
— cohaerens, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— coli, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— —, schädliches Auftreten im Darm. 271
— —, Vorkommen in Milch. 269
— cylindricus, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Nitritspeicherung. 383
— diphtheriae, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— dysenteriae, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— ellenbachensis, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Nitritspeicherung. 383
— exilis, n. sp., Vorkommen im Liptauer Käse. 508
— flavus colisimilis, Vorkommen in Kleie. 21
— fluorescens, Vorkommen im Liptauer Käse. 498
— — liquefaciens, Vorkommen im Boden. 276
— fusiformis, Nitritspeicherung. 383
— —, Vorkommen im Liptauer Käse. 511
— graveolens, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
— — Ammoniakspeicherung. 383
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— gravidus, Vorkommen im Liptauer Käse. 505
— indolicus, Vorkommen im Liptauer Käse. 511
— lactis, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Nitritspeicherung. 383
— lacticola, Nitritspeicherung. 383
— liquefaciens, Vorkommen in Kleie. 21.
— luteus, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— — sporogenes, Vorkommen im Liptauer Käse. 504
— mallei, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— megatherium, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
Bacillus megatherium, Aufteilung in verschiedene Spezies. 300
— —, Nitratreduktion, Bedeutung der im Nitrat enthaltenen Base. 412
— —, Vorkommen in Erdnußmehl. 139. 145. 150—153
— —, — — Kleie. 83. 84
— —, — — Sesamkuchen. 199. 218
— —, — — Sesammehl. 164. 167. 182. 194—198
— mesentericus, Vorkommen in Erdnußkuchen. 154—159
— —, — — Erdnußmehl. 99. 102. 103. 120. 122. 139. 145. 149. 150—153
— —, — — Kleie. 17. 24. 26. 50. 51. 80. 84
— —, — — Milch. 32. 123. 140. 167. 202
— —, — — Sesamkuchen. 199—201. 215. 216. 218—220
— —, — — Sesammehl. 164. 165. 167. 182. 186—192. 194—198
— — aureus, Identität mit Bacterium herbicola aureum. 22
— — fuscus, Erreger von Schleimkrankheit der Milch. 263
— — vulgatus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— mucosus, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— mycoides, Aufteilung in verschiedene Spezies. 300
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— —, Vorkommen in Kleie. 85
— —, — — Sesamkuchen. 199. 219
— oxalaticus, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
— —, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Nitratreduktion, Bedeutung der im Nitrat enthaltenen Base. 412
— —, Vorkommen in Sesamkuchen. 218
— —, — — Sesammehl. 164. 194. 196. 197
— parabutyricus, Vorkommen im Liptauer Käse. 511
— parvus, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— —, Nitritspeicherung. 383
— —, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— perfringans, schädliches Vorkommen im Darm. 271
— petasites, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— —, Nitratreduktion, Bedeutung der Base im Nitrat. 412

Bacillus prodigiosus, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
— pumilus, Ammoniakspeicherung. 383
— —, Nitritspeicherung. 383
— —, Vorkommen in Liptauer Käse. 504
— putrificans, schädliches Vorkommen im Darm. 271
— putrificus coli, Vorkommen in Erdnußkuchen. 156. 158. 159
— — —, — — Erdnußmehl. 122. 139. 145. 149. 150—153
— — —, — — Kleie. 24. 26. 29
— — —, — — mit Kleie verunreinigter Milch. 40
— — —, — — Sesamkuchen. 200. 218—220
— — —, — — Sesammehl. 194. 196—198
— pyocyaneus, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— radicicola, Bodenimpfung. 286
— —, Virulenz bei Kalkmangel. 285
— robur, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— robustus, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— sesami, Vorkommen an Sesampflanze. 162
— silvaticus, Ammoniak und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Vorkommen im Liptauer Käse. 506
— simplex, Ammoniakspeicherung. 386
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Nitritspeicherung. 383
— sphaericus, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— submergens n. sp., Vorkommen im Liptauer Käse. 507
— subtilis, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 410
— —, Ammoniakspeicherung. 386
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— —, Aufteilung in verschiedene Spezies. 300
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— —, Nitratreduktion. 391
— —, —, Bedeutung der Base im Nitrat. 412
— —, Nitritspeicherung. 383
— —, Vorkommen in Erdnußkuchen. 95. 154. 156. 158. 159
— —, — — Erdnußmehl. 99. 102. 103. 120. 121. 139. 145. 149. 150—153
— —, — — Milch. 32
— —, — — Sesamkuchen. 218—220
Bacillus subtilis, Vorkommen in Sesammehl. 167. 182. 194—197
— —, Wachstum, Beziehung zur Ammoniakspeicherung. 416
— —, —, — — Nitratzersetzung. 417
— teres, Ammoniakspeicherung. 386
— —, Nitritspeicherung. 383
— — (?), Vorkommen im Liptauer Käse. 505
— tostus, Verhalten gegenüber Nitratstickstoff. 381
— tumescens, Ammoniakbildung. 401
— —, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
— —, Ammoniakspeicherung. 386
— —, Assimilation von Nitriten. 401
— —, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
— —, Nitratreduktion, Bedeutung der Base im Nitrat. 412
— —, Vorkommen in Erdnußmehl. 99. 139. 145
— —, — — Kleie. 83
— —, — — Sesamkuchen. 199. 215. 218. 220
— —, — — Sesammehl. 164. 182. 187. 188. 194. 196. 197
— —, Wachstum, Beziehung zur Ammoniakspeicherung. 418
— typhosus, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
— vulgatus, Vorkommen im Liptauer Käse. 508
— welchii, Vorkommen in Kohle. 463
Backhausmilch, Bakteriengehalt. 262
Bacterium und Actinomyces. Bildung von Melanin. 248
Bacterium acidi lactici, Vorkommen in Erdnußkuchen. 154—159
— — —, — — Erdnußmehl. 99. 101. 102. 103. 120. 121. 122. 139. 145. 149. 150—153
— — —, — — Kleie. 17. 24. 26. 29. 50. 51. 54. 69. 77. 78. 81. 83. 84. 85
— — —, — im Liptauer Käse. 485
— — —, — in Milch. 32. 104. 123. 140. 167. 202
— — —, — — Sesamkuchen. 199—201. 215. 218—220
— — —, — — Sesammehl. 165. 167. 182. 186. 187—192. 195—198
— — propionis var. ruber, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— adipis n. sp., Vorkommen im Liptauer Käse. 501
— aërogenes s. a. Bacterium lactis aerogenes.
— —, Vorkommen in Erdnußkuchen. 154—159
— —, — — Erdnußmehl. 99. 103. 122. 139. 145. 150—153
— —, — — Milch. 33. 104. 123
— —, — — Sesamkuchen. 216

Bacterium aërogenes, Vorkommen in Sesammehl. 187—192. 197
— casei, Vorkommen im Liptauer Käse. 495
— chrysogloea, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— coli, Vorkommen in Erdnußkuchen. 155. 158. 159
— —, — — Erdnußmehl. 103. 145. 149. 150—153
— —, — — Kleie. 21. 26. 29. 51. 54. 69. 78
— —, — — Milch. 32. 140. 167
— —, — — Sesamkuchen. 200. 201. 216. 218—220
— —, — — Sesammehl. 164. 165. 167. 182. 190. 191. 195. 196
— — commune, Vorkommen in Erdnußmehl. 96
— — —, — — Kleie. 24
— cremoides, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— fluorescens, Bildung von Trimethylamin. 93
— —, Farbstoffbildungsvermögen, Verlust. 25
— —, Vorkommen in Erdnußkuchen. 154. 156. 158. 159
— —, — — Erdnußmehl. 99. 102. 103. 120. 121. 122. 139. 145. 149. 150—153
— —, — an Getreidepflanzen. 22
— —, — — Kleie. 17. 24. 26. 29. 50. 54. 69. 77. 78. 80. 81. 83. 84
— —, — im Liptauer Käse. 517
— —, — — Milch. 32. 104. 123. 140. 167 202
— —, — — Sesamkuchen. 200. 201. 215. 216. 218. 219
— —, — — Sesammehl. 164. 167. 182. 188—192. 194—197
— fulvum, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— furfuris, Erreger der Kleiegärung. 20
— güntheri, Vorkommen in Erdnußkuchen. 155. 157. 159
— —, — — Erdnußmehl. 101. 102. 103. 121. 122. 149. 150—153
— —, — — Kleie. 17. 26. 29. 50. 51. 54. 81. 83
— —, — — Milch. 33. 104. 123. 140. 167. 202
— —, — — Sesamkuchen. 200. 201. 216. 218. 220
— —, — — Sesammehl. 165. 167. 187—192. 197. 198
— helvolum, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— herbicola aureum, Identität mit Bacillus mesentericus aureus. 22
— — aureum, Vorkommen in Erdnußmehl. 120
— — —, — an Getreidepflanzen. 22
— — —, — — Kleie. 17. 24. 26. 29. 50. 51. 54. 77. 80. 83. 84. 85
Bacterium herbicola aureum, Vorkommen an Sesamkuchen. 219
— — —, — — Sesammehl. 164. 182. 194. 198
— — rubrum, Vorkommen in Sesammehl. 164
— lactis aërogenes s. a. Bacterium aërogenes.
— — —, Essigsäurebildung aus Milchzucker. 245
— — —, Vorkommen in Kleie. 17. 24. 26. 29. 51. 54
— — —, — — Milch. 33. 104. 123
— — innocuum, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— latericium (?), Vorkommen im Liptauer Käse. 502
— levans, Vorkommen in Kleie. 80. 81
— —, — — Sesammehl. 164. 194
— ochraceum, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— punctatum, Vorkommen in Kleie. 69. 77. 78. 80. 81
— —, — — Sesammehl. 194
— putidum, Vorkommen in Erdnußkuchen. 154. 156. 159
— —, — — Erdnußmehl. 99. 145. 149. 150
— —, — an Getreidepflanzen. 22
— —, — in Kleie. 17. 29. 54. 69. 80. 81. 83. 84
— —, — im Liptauer-Käse. 498
— —, — in Milch. 32. 140. 167
— —, — — Sesamkuchen. 219
— —, — — Sesammehl. 164. 188—192. 194. 195
— rufum, Vorkommen im Liptauer Käse. 502
— saponificans n. sp., Vorkommen im Liptauer Käse. 501
— turcosum var. immobilis, Vorkommen im Liptauer Käse. 498
— vulgare, Vorkommen in Kleie. 83
— —, — — Sesammehl. 196
— zopfii, Vorkommen in Erdnußmehl. 102. 145
— —, — — Sesamkuchen. 199. 215. 218—220
— —, — — Sesammehl. 194—196. 197
Bäume, Schleimfluß, Vorkommen von Essigbakterien. 244
Bakterien, Ammoniak- und Nitritbildung, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 409
—, Ammoniakspeicherung. 383
—, Bildung von Trimethylamin. 93
—, Bildung organischer Verbindungen im Boden. 276
—, Boden-, Ammoniakbildung in kultiviertem und unbearbeitetem. 449
—,—, Nitratbildung, antagonistische Wirkung von Anionen. 430
—, —, — in kultiviertem und unbearbeitetem Boden. 451

Bakterien, Boden-, Stickstoffbindung in kultiviertem und unbearbeitetem Boden. 453
—, —, Tätigkeit in kultiviertem und unbearbeitetem Boden. 444
—, Butter-, Wirkung auf Kaseïn. 272
—, Chromatin, Produkt der Stoffwechselvorgänge. 646
—, Essig-, Vorkommen im Schleimfluß der Bäume. 244
—, Essigsäure-, Schädlinge in Gärungsbetrieben. 245
—, Färbung. 302
—, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
—, Gasbildung, Wirkung von Nitraten und Nitriten. 423
—, Giftwirkung von Nitriten, Bedeutung der Reaktion des Nährbodens. 403
—, Knöllchen-, Impfung von Hochmoorboden. 285
—, —, — — Kulturboden. 286
—, — von Rotklee, Unverträglichkeit mit denen von Lupine bei Kalkmangel. 286
—, — — —, — — — — Serradella bei Kalkmangel. 286
—, —, Verwandtschafts-Verhältnisse. 470
—, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
—, Milchsäure-, gasbildende, Variabilität. 7
—, —, Impfung von Schnitzeln. 298
—, —, Vorkommen im Liptauer Käse. 485
—, von Nitratreduktion. 380
—, Nitratreduktion, Bedeutung der Base im Nitrat. 412
—, —, Verlauf. 419
—, Speicherung von Nitrit. 383
—, Sporen, Chromatingehalt. 641
—, —, Chromatinschwund beim Altern. 641
—, Tätigkeit im Boden, Bedeutung des Wassergehaltes. 276
—, Vorkommen im Boden. 276
—, — in Erdnußmehl. 94. 96. 101. 102. 103
—, — — Kleie. 17. 21. 24. 26. 29. 50. 51. 54. 69. 77. 78. 80. 81. 83. 84. 85
—, — — Milch. 32. 33. 104. 269
—, — — schleimiger Milch. 263
—, — — Sesammehl. 164
—, — — fermentierendem Tee. 298
—, Wachstum, Beziehung zur Ammoniak- und Nitritbildung. 413
—, —, — — Nitratreduktion. 413
—, Wirkung ätherischer Öle. 548
—, Zählung, Methodik. 379
—, zellulosezerstörende, Physiologie. 296
Bakterienflora von Getreidekörnern, Veränderung bei trockener Aufbewahrung. 20
— — Kraftfuttermitteln, Wirkung auf Milch. 1
Bakteriengehalt des Bodens in der Campagna. 276
Bakteriengehalt von Enzymamilch. 262
— — Handelsmilch. 261
— — Kohle, Untersuchung. 460
— der Luft, Untersuchung. 299
— — Milch, Veränderung durch Zusatz von Sesamkuchen. 201—212
— — —, Wirkung frischen Erdnußmehls. 106. 111. 124. 141. 146
— — —, — von frischem Sesammehl. 167. 174
— — —, — gärenden Erdnußmehls. 109. 111. 131. 143. 147
— — —, Veränderung durch Zusatz gärender Kleie. 38
— — —, — — — gärenden Sesammehls. 170—174. 176—179
— kondensierter Milch. 266
— der mit Maschine gemolkenen Milch. 308
— von Uviolmilch. 262
— — Waldboden in verschiedenen Tiefen. 277
Bakterienkrankheit der Junikäferlarven. 321
Bakteriologie, landwirtschaftliche Vorlesungen. 241
Baumwollsaatmehl, Wirkung auf die Qualität der Butter. 20
Betaïn, Bildung von Glykolsäure durch Willia anomala. 245
Bier, Zusammensetzung. 256
Biorisatorverfahren zur Herstellung keimarmer Milch. 305
Birnbaum, Beschädigung durch Xex. 239
—, Blattläuse, Bekämpfung mit Golaz. 239
—, rote Schildlaus, Bekämpfung mit Antiparassit. 239
Birnenmehltau, Bekämpfung mit Schwefelkalkbrühe. 239
Bittermandelöl, Wirkung der Dämpfe auf Pflanzen. 548
Bitterwerden des Weines. 244
Blattläuse, Bekämpfung mit Golaz an Birn- und Pflaumenbäumen. 239
—, — — Xex. 239
—, Bekämpfungsversuche mit Lysokreosol. 239
—, — — Creolinum viennense. 239
—, — — Raupus. 239
—, Spritzversuche. 239
Blumea balsamifera, Vorkommen von Linksborneol. 555
Blutläuse s. a. Schizoneura lanigera.
—, Bekämpfung mit Lohsol. 240
—, Bekämpfungsversuche mit Creolinum viennense. 239
—, — — Lysokreosol. 239
—, — — Raupus. 239
Boden, Aktinomycetengehalt. 655
—, Ammoniakbildung in verschiedenen Monaten. 587
—, Ammoniakverdunstung, Untersuchung. 280
—, Bakteriengehalt in der Campagna. 276

Boden, Bakteriengehalt von kultiviertem und unbearbeitetem. 447
—, —, Wirkung ätherischer Öle. 560
—, Bakterientätigkeit, Bedeutung des Wassergehaltes. 276
—, bakteriologische Untersuchung, neue Methode. 312
—, Bildung organischer Verbindungen durch Hefe. 276
—, Denitrifikation, Bedeutung des Wassergehaltes. 608
—, Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes. 545
—, Erbsenmüdigkeit. 276
—, Feuchtigkeit, Bedeutung für das Auftreten von Bakterienkrankheit der Lachnosterna-Larven. 329
Boden, Hochmoor-, Impfung mit Knöllchenbakterien. 285
—, Impfung mit Knöllchenbakterien auf Kulturland. 286
—, Impfungsversuche mit Azotobacter chroococcum. 286
—, — — Bacillus radicicola. 286
—, Infektion mit Isaria densa zur Bekämpfung der Engerlinge. 322
—, Kalkmangel, Bedeutung für die Unverträglichkeit von Knöllchenbakterien. 286
—, katalytische Kraft. 282. 284
—, Leinmüdigkeit. 276
—, Mikroflora, Schlammsauger. 312
—, Nährstoffverluste verschiedener Bodenarten. 293
—, Nitratbildung in verschiedenen Monaten. 585
—, organische Verbindungen, Bildung durch Bakterien und Schimmelpilze. 276
—, Protozoengehalt verschiedener Bodenarten. 625
—, Stickstoff, Festlegung durch Zeolithe. 282
—, Stickstoffbindung in verschiedenen Monaten. 591
—, Stickstoffsammlung bei dauerndem Roggenbau. 279. 632
—, —, Wirkung von Phonolith und Kalktraß. 291
—, Stickstoffumsetzungen, Untersuchungen. 577
—, Stickstoffverluste. 281
—, Verbesserung durch Pinus maritima. 546
—, Verunreinigungen, seitliche Ausbreitung. 278
—, Vorkommen von Aktinomyceten in verschiedenen Arten. 656
—, — — Bakterien. 276
—, — — Colpoda cucullus. 627
—, Wald-, Bakteriengehalt in verschiedenen Tiefen. 277
—, —, Pilzgehalt in verschiedenen Tiefen. 277
—, Wasserhaushalt, Bedeutung der Gründüngung. 289
Boden, Wasserverluste verschiedener Bodenarten. 293
—, Zersetzung von Kalkstickstoff durch Kolloide. 283
Bodenbakterien s. Bakterien, Boden-.
Bodengeruch durch Actinomyces odorifer. 655
Bodenkolloide, Zersetzung von Kalkstickstoff. 283
Böckser des Weines, Ursache. 243
Bohne s. a. Phaseolus vulgaris u. Vicia faba.
—, Knöllchenbakterien, Identität mit denen von Erbse. 470
—, Schädigung durch Junikäfer. 321
Bonit, Vorkommen von Aspergillus sulfureus. 353
Bornylformiat, Wirkung auf den Bakteriengehalt des Bodens. 560
Botrytis tenella s. Isaria densa.
Brache, Vergleich mit Stalldüngung und Kleebau. 291
Brauereiwasser s. Wasser, Brauerei-.
Braunwerden des Weines. 243
Brenztraubensäure, Spaltung durch Karboxylase. 247
Brugmansia zippelii, Biologie. 300
Buchweizen, Entwicklung in Buchen- und Fichtenhumus. 551
Burmannia candida, Beschreibung. 300
— championii, Beschreibung. 300
— coelestis, Beschreibung. 300
Butter, Fehler. 275
—, Stallgeruch. 275
—, Übertragung von Infektionskrankheiten. 268
—, Wirkung von Baumwollsaatmehl auf die Qualität. 20
—, — — Kleie auf die Qualtität. 20
Butterbakterien, s. Bakterien, Butter-.
Buttermilch, Prüfung. 275
Buttersäurestich des Weines. 244

Caeoma pseudotsugae douglasii n. sp., Schädling von Pseudotsuga douglasii. 480
Calciumkarbonat, Wirkung auf die Lebensdauer von Bacillus bulgaricus. 270
Campagna, Bakteriengehalt des Bodens. 276
Carven, Wirkung auf den Bakteriengehalt des Bodens. 560
—, — — keimende Samen. 555
Caseolin, Wirkung auf die Lochbildung im Emmentaler Käse. 275
Castanea, Infektion mit Endothia gyrosa var. parasitica. 240
—, Infektionsversuche mit Endothia gyrosa. 240
Catenularia fuliginea, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
Chalara mycoderma, Vorkommen in schleimiger Milch. 263
Chamaecyparis nutkaensis, Schädigung

durch Uredo chamaecyparidis nutkaensis. 480
Chilisalpeter, Vergleich mit Kalkstickstoff, schwefelsaurem Ammoniak und Stickstoffkalk. 294
Chlorkalk, Sterilisierung von Trinkwasser. 313
Cholesterin, Vorkommen in Kleie. 19
Chromatium, Schwefelwasserstoffbildung. 258
Chamaecyparis lawsoniana, Schädigung durch Fusarium. 638
Chinon, Bildung durch Actinomyces chromogenes. 655
Chlorkalk, Sterilisierung von Trinkwasser. 635
Chromatin, Stoffwechselprodukt der Bakterien. 646
—, Vorkommen in Bakteriensporen. 641
Chrysophlyctis endobiotica s. a. Kartoffel, Krebs.
— —, Schädling der Kartoffel. 636
Cicer arietinum, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Cinchoninsäure, Stickstoffquelle für Pilze und Hefen. 245
Citromyces glaber, Verhalten gegenüber verschiedenen Stickstoffquellen. 297
— pfefferianus, Verhalten gegenüber verschiedenen Stickstoffquellen. 297
Citrus, Öl, Wirkung auf Bakterien. 549
Cladosporium herbarum, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
Cladothrix chromogenes, Abscheidung von Tyrosinkristallen. 655
— —, Ammoniakbildung. 655
— —, Propeptonbildung. 655
Clostridium, aërobes, Stickstoffbindung. 295
—, Vorkommen in Erdnußkuchen. 95
Clysia ambiguella, Einschleppung nach Deutschland. 638
Colpoda cucullus, Vorkommen im Boden. 627
Cotoneaster horizontalis, Schädigung durch Schizoneura lanigera. 640
Creolinum, viennense, Bekämpfungsversuche gegen Blatt- und Blutläuse. 239
— —, — — Fusicladium. 239
Cyklamin, Wirkung auf Alkoholgärung. 253

Darm, Vorkommen schädlicher Bakterien. 271
Denitrifikation im Boden, Bedeutung des Wassergehaltes. 608
Desinfektionsmittel, Kombination. 237
Deutschland, erstes Auftreten von Nysius senecionis an Weinstöcken. 640
—, Vorkommen von Diestrammena marmorata in Gewächshäusern. 239
Diaporthe parasitica, Schädling von Quercus in Nordamerika. 240
— —, Zugehörigkeit zu Endothia gyrosa. 240
Diastase, Bildung durch Aktinomyceten. 671
Diastrammena marmorata, Schädling von Ananas in Gewächshäusern. 239
Dill, Vorkommen von Carven. 555
Diphtherie, Übertragung durch Milch. 268
Diplococcus, Vorkommen in Sesamkuchen. 199. 200. 215. 218—220
—, — — Sesammehl. 186. 187
Diplodia, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
Dolichos, Ausbleiben spontaner Knöllchenbildung. 479
— multiflorus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Dresden, Station für gärtnerischen Pflanzenschutz. 240
Dryobalanops, Vorkommen von Borneol. 555
Dünger, Stall- s. a. Mist, Stall-.
—, —, Vergleich mit Brache und Kleebau. 291
Düngung, Grün-, Bedeutung für den Wasserhaushalt des Bodens. 289
—, —, Kohlensäurebildung, Wirkung auf die Entwicklung der Pflanzen. 290
—, —, Verbleib des Stickstoffs im Sandboden. 287
—, —, Wert verschiedener Pflanzen. 286
—, —, Wirkung. 286

Eiche s. a. Quercus.
—, Essigfluß. 244
Einsäuern von Kartoffeln mit Stoppelklee. 298
Eiweiß, Aufbau durch Hefe. 252
Eiweißmilch, Herstellung. 306
Emmentalerkäse s. Käse, Emmentaler-.
Endothia gyrosa, Infektionsversuche mit Castanea. 240
— —, — — Quercus. 240
— —, Zugehörigkeit von Diaporthe parasitica. 240
— — var. parasitica, in Amerika heimisch. 240
— — — —, Infektion von Castanea. 240
— — — —, — — Quercus. 240
Engerlinge, Bekämpfung durch Infektion des Bodens mit Isaria densa. 322
Enzymamilch, Bakteriengehalt. 262
Enzyme, Bildung, Ursache. 246
Erbse s. a. Pisum sativum.
—, Knöllchenbakterien, Identität mit denen von Bohnen. 470
—, Samen, Vorkommen von Karboxylase. 247
Erbsenmüdigkeit des Bodens. 276
Erdbeerpflanze, Schädigung durch Lachnosterna. 321
Erdnußkuchen, Vorkommen von Bakterien. 95. 99
Erdnußmehl, frisches, Wirkung auf den Bakteriengehalt der Milch. 106. 111. 124. 141. 146

Erdnußmehl, gärendes, Wirkung auf den Bakteriengehalt der Milch. 109. 111. 131. 143. 147
—, Gärung, bakteriologische Untersuchung. 100
—, Giftwirkung infolge Zersetzung durch Mikroorganismen. 93
—, verdorbenes, Schädigung von Kühen und Pferden. 93
—, Vorkommen von Bakterien. 94. 96. 101. 102. 103
—, — — Hefe. 102
—, — — Schimmelpilzen. 94. 96
—, Zusammensetzung. 92
Essig, Bereitung in Orleans. 244
Essigbakterien s. Bakterien, Essig-.
Essigfluß der Eiche. 244
Essigsäure, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
—, Bildung durch Bacterium lactis aërogenes aus Milchzucker. 245
—, — bei Kleiegärung. 20
Essigsäuregärung s. Gärung, Essigsäure-.
Eucalyptusöl, Wirkung auf Bakterien. 549
Eulimneria costalis, natürlicher Feind von Schistodepressaria nervosa. 233
Euter, Histologie. 263
Exoascus aureus, Schädling von Populus canadensis. 480
— —, — — Populus nigra. 480
— —, — — Populus siemonii. 480
— —, — — Populus trichocarpa. 480

Fanggürtel, Wert als Bekämpfungsmittel gegen Apfelwickler. 239
Farbstoff, Bildung durch Aktinomyceten, Bedeutung des Nährbodens. 662
—, — — Pilze. 654
Farbstoffbildungsvermögen von Bacterium fluorescens, Verlust. 25
Fermente der Milch, Untersuchung. 246
—, proteolytische, Vorkommen in Milchdrüsen. 247
Fette, ranzige, Vorkommen von Mikroorganismen. 92
Feuchte Kammer, Herstellung einer einfachen. 302
Flugbrand von Gerste und Weizen, Bekämpfung mit Heißwasser. 637
— des Weizens, Bedeutung der Saatzeit für das Auftreten. 638
Frankreich, Bekämpfung der Junikäfer mit Isaria densa. 322
Frost, Wirkung auf die Zusammensetzung von Most und Wein. 255
Frostspanner, Bekämpfung mit Antiparasit. 240
Fusarium, Schädling von Chamaecyparis lawsoniana. 638
—, — — Thuja occidentalis. 638
Fuselöl, Bildung durch Hefe. 243
Fusicladium, Bekämpfungsversuche mit Creolinum viennense. 239
—, — — Schwefelkalkbrühe. 239

Futtermittel, gärende, Gewinnung und Verarbeitung. 10

Gärung, Alkohol-, Wirkung von Atmungschromogenen. 249
—, —, — — Cyklamin. 253
—, Erdnußmehl-, bakteriologische Untersuchung. 100
—, Essigsäure-, Geschichte. 244
—, Hefe-Zwischenprodukte. 254
—, Most-, Verwendung von Reinhefen. 243
—, Wein-, Wirkung äußerer Bedingungen. 243
—, —, — von Pilzgiften. 243
Gärungsbetriebe, Schädigung durch Essigsäurebakterien. 245
Gärungsvorgänge, populäre Darstellung. 250
Gas, Bildung durch Bakterien, Wirkung von Nitraten und Nitriten. 423
Gerste, Bakterienflora der Körner, Veränderung bei trockener Aufbewahrung. 20
—, Flugbrand, Bekämpfung mit Heißwasser. 637
—, Keimpflanzen, bakteriologische Untersuchung. 22
—, Streifenkrankheit, Bedeutung der Saatzeit für das Auftreten. 638
Gervaiskäse s. Käse, Gervais-.
Getreide, Bakterienflora der Körner, Veränderung bei trockener Aufbewahrung. 20
—, chemische Veränderung der Körner durch Schimmelpilze. 21
—, Keimpflanzen, bakteriologische Untersuchung. 22
—, Körner, Vorkommen von Karboxylase. 247
Gift, Bildung durch Mikroorganismen in Erdnußmehl. 93
Glycobacter peptolyticus, Bedeutung für die Vernichtung der Fäulnisbakterien im Darm. 272
Glykolsäure, Bildung aus Betaïn durch Willia anomala. 245
Golaz, Bekämpfungsmittel gegen Blattläuse an Birn- und Pflaumenbäumen. 239
Gründüngung s. Düngung, Grün-.
Guajakperoxydase, Vorkommen in Milchdrüsen. 247
Gülle, benzoësaure Salze, Beziehung von Schimmelpilzen. 295
Gymnosarda affinis, Bereitung von Katsuobushi. 351
Gymnosporangium japonicum, Schädling von Juniperus chinensis f. compacta in Amerika. 240

Hafer, Keimpflanzen, bakteriologische Untersuchung. 22

Hafer, Wirkung von Schwefel auf das Wachstum. 295
Haferspelzen, Vorkommen in Kleie. 19
Hamburg, Milchversorgung. 264
Handelsmilch s. Milch, Handels-.
Hansenia, Wärmebildung. 251
Harnsäure, Zersetzung durch Citromyces glaber und C. pfefferianus. 297
Hefe s. a. Saccharomyces cerevisiae.
—, Assimilation gärfähiger Zuckerarten. 253
—, Bildung von Fuselöl. 243
—, — organischer Verbindungen im Boden. 276
—, Bindung von Ammoniak. 252
—, Eindringen von Methylenblau in trokkene Zellen. 302
—, Erreger des Fruchtgeruchs von Käse. 272
—, Eiweißaufbau. 251
—, gärfähige Vorkommen in alten Weinen. 243
—, Gärung, Zwischenprodukte. 254
—, Soja-, Asporogenität. 364
—, Thermogenität in Glukosewürze. 251
—, Verwendung von Reinkulturen für die Mostgärung. 243
—, Vorkommen in Erdnußmehl. 102
—, — — ranzigen Fetten. 92
—, — von Invertase trotz langer Zucht in Glukose. 246
—, — in fermentierendem Tee. 298
—, Wärmebildung. 251
—, wilde, Umwandlung von Aminen in Alkohole. 245
—, Züchtungsmethoden. 250
Heißwasser, Bekämpfungsmittel gegen Weizen- und Gerstenflugbrand. 637
Hippursäure, Zersetzung durch Citromyces glaber und C. pfefferianus. 297
Hochmoorboden s. Boden, Hochmoor-.
Hordenin, Umwandlung in Tyrosol durch Willia anomala. 245
Humifizierung von Pflanzenresten, Bedeutung der Aktinomyceten. 659
Humus, Fichten-, Entwicklung von Buchweizen. 551

Java, Saprophyten. 300
Impatiens sultani, Wirkung von Terpentindämpfen. 557
Infektionskrankheiten, Übertragung durch Butter und Sahne. 268
Insekten, Lebensgewohnheiten und Instinkte. 633
Intestibakter, Bedeutung für die Vernichtung der Fäulnisbakterien im Darm. 272
Invertase, Bildung durch Aktinomyceten. 671
—, Vorkommen in Hefe trotz langer Zucht in Glukose. 246
Johannisbeerstrauch, Schädigung durch Polychrosis botrana. 640
Isaria densa, Infektion des Bodens zur Bekämpfung der Engerlinge. 322
— —, natürlicher Feind von Melolontha vulgaris. 322
Isarien, Bedeutung als natürliche Feinde der Traubenwickler. 639
Isobutylacetat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Isobutylalkohol, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Isobutylformiat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Junikäfer s. a. Lachnosterna.
—, Bakterien natürliche Feinde. 322
—, Insekten natürliche Feinde. 322
—, Larve, Bakterienkrankheit. 321
—, natürliche Feinde. 322
—, Pilze natürliche Feinde. 322
—, Vorkommen in Amerika an verschiedenen Wirtspflanzen. 321
—, — — Porto Rico. 321
—, Wirtspflanzen. 321
Juniperus chinensis f. compacta, Schädigung durch Gymnosporangium japonicum in Amerika. 240

Käse, einseitig geblähter. 274
—, Emmentaler-, Lochbildung, Wirkung von Kaseolin. 275
—, Fehler. 274
—, Fruchtgeruch durch Hefen. 272
—, Gasbildung, Unterdrückung durch Bacillus bulgaricus. 272
—, Gervais-Herstellung. 273
—, Liptauer-, bakteriologische Untersuchung. 485
—, —, Geschmacks- und Geruchsänderungen. 537
—, —, Konsistenzänderungen. 537
—, —, Reifung, Bedeutung der Mikroflora. 481
—, —, Scharfwerden, Unabhängigkeit vom Keimgehalt. 515
—, —, —, Ursache. 483
—, —, —, Verhinderung. 545
—, Weich-, Herstellung. 273
Kalkstickstoff, Vergleich mit Chilisalpeter, schwefelsaurem Ammoniak und Stickstoffkalk. 294
—, Zersetzung durch Bodenkolloide. 283
Kalktraß, Wirkung auf die Stickstoffsammlung im Boden. 291
Karboxylase, Spaltung von Brenztraubensäure. 247
—, Vorkommen in Pflanzen. 247
—, — an Schimmelpilzen. 247
Kartoffel, Einsäuern mit Stoppelklee. 298
—, Krebs, Bekämpfung durch Bodenbehandlung mit Ventilato-Schwefel. 646
—, — durch Chrysophlyctis endobiotica. 636
—, Schädigung durch Chrysophlyctis endobiotica. 636
—, — — Junikäfer. 321

Kartoffelnährböden für Bakterienkulturen. 303
Kasol, Wirkung auf den Säuregrad des Labs. 273
Katsuobushi, Aspergillus-Arten, Untersuchung. 351
—, Auftreten von Aspergillus glaucus. 352
—, — — Aspergillus gymnosarda. 351
—, — — Aspergillus melleus. 351
—, Bereitung aus Gymnosarda affinis. 351
—, Vorkommen von Schimmelpilzen. 352
Kautschuk, Fleckenbildung durch Bakterien und Pilze. 297
Kirschbaum, Schädigung durch Orchestes fagi. 640
Kleebau, Vergleich mit Brache und Stalldüngung. 291
Kleie, Bakterienflora. 17
—, Fettbestandteile, Untersuchung. 19
—, frische, Bakterienflora. 24
—, —, Wirkung auf den Bakteriengehalt der Milch. 35
—, gärende, Wirkung auf den Bakteriengehalt von Milch. 38
—, Gärung durch Bacterium furfuris. 20
—, —, Bakterienflora. 17. 26
—, Krüschkrankheit der Pferde durch dieselbe. 22
—, Verfälschungen. 19
—, Vorkommen von Bakterien. 17. 21. 24. 26. 69. 80. 83. 84
—, — — Milzbranderreger. 80. 83. 84
—, — — Schimmelpilzen. 21. 22
—, Wirkung auf die Qualität der Butter. 20
Knöllchenbakterien s. Bakterien, Knöllchen-.
Kochsalzdüngung, Ertragssteigerung bei Zuckerrüben. 290
Kohle, Absorptionskraft. 468
—, Bakteriengehalt, Untersuchung. 460
Kohlensäurebildung bei Gründüngung, Wirkung auf die Entwicklung der Pflanzen. 290
— durch Stallmist, Wirkung auf die Entwicklung der Pflanzen. 290
Kohlenstoffquellen, flüchtige organische, für Schimmelpilze. 647
Koji, Bereitung, Bedeutung von Aspergillus oryzae. 257
—, Verwendung zur Bereitung von Soja. 257
Kräuselkrankheit des Pfirsichbaumes, Bekämpfung mit Schwefelkalkbrühe. 239
Kraftfuttermittel, Bakterienflora, Wirkung auf Milch. 1
Krebs der Kartoffel, Bekämpfung durch Bodenbehandlung mit Ventilato-Schwefel. 646
Krüschkrankheit der Pferde durch Kleie. 22
Kühe, Milchproduktion, Wirkung von Sesamfütterung. 162
Kühe, Schädigung durch Fütterung mit verdorbenem Erdnußmehl. 93
Kümmel, Vorkommen von Carven. 555

Lab, Säuregrad, Wirkung des Kasols. 273
Laburnum vulgare, Impfversuche. 472
Lachnosterna s. a. Junikäfer.
—, Larve, Bakterienkrankheit, Bedeutung der Bodenfeuchtigkeit. 329
—, —, Beschreibung. 323
—, Larven, Nachweis von Micrococcus nigrofaciens. 328
—, Pyrgota undata natürlicher Feind. 322
Lactobacillus fermentum, Mannitbildung. 261
— —, Unterschied von L. delbrücki. 259
— —, Vergärung verschiedener Zuckerarten. 259
Lacto-Pülpe, Wert zur Impfung von Schnitzeln. 298
Larix sibirica, Vorkommen von Linksborneoazetat. 555
Larosanmilch s. a. Eiweißmilch.
— zur Säuglingsernährung. 268
Lathyrus odoratus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— silvestris, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Lavendelöl, Wirkung auf Bakterien. 549
Lecithin, Vorkommen in Kleie. 19
Leguminosen, Knöllchenbakterien, Verwandtschaftsverhältnisse. 470
—, Kultur. 285
Leinmüdigkeit des Bodens. 276
Lepidium sativum, Wirkung von Terpentindämpfen. 557
Lespedeza striata, Ausbleiben spontaner Knöllchenbildung. 479
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Licht, ultrarotes, Wirkung auf die Sprossung von Saccharomyces cerevisiae. 349
—, ultraviolettes, Wirkung auf die Sprossung von Saccharomyces cerevisiae. 347
—, Wirkung auf die Sprossung von Saccharomyces cerevisiae. 340
—, — — — — — Saccharomyces ludwigii. 341
Linksweinsteinsäure, biochemische Herstellung. 297
Liptauer Käse s. Käse, Liptauer-.
Lohsol, Bekämpfungsmittel gegen Blutlaus. 240
Lotus corniculatus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— uliginosus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Luft, Bakteriengehalt, Untersuchung. 299
—, Kondensationskerne. 299
Lupine, Knöllchenbakterien, Unverträglichkeit mit denen von Rotklee bei Kalkmangel. 286
—, Samen, Vorkommen von Karboxylase. 247

Lupinus angustifolius, Impfung mit Knöllchenbakterien von Ornithopus sativus. 472

— luteus, Impfung mit Knöllchenbakterien von Ornithopus sativus. 472

Lysokresol, Bekämpfungsmittel gegen Schildläuse. 239

—, Bekämpfungsversuche gegen Blatt- und Blutläuse. 239

Mäuseln des Weines. 244

Mais, Körner, Vorkommen von Karboxylase. 247

—, Schädigung durch Junikäfer. 321

Mannit, Bildung durch Lactobacillus fermentum. 261

—, — — Saccharobacillus pastorianus. 261

Mannitgärung des Weines. 244

Mastitis-Streptokokken, Vorkommen in Handelsmilch. 261

Medicago lupulina, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472

— sativa, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472

Meeresbakterien, Untersuchung. 258

Melampsora, Schädling von Populus trichocarpa. 480

Melanin, Bildung durch Actinomyces und Bacterium. 248

Melilotus albus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472

Melolontha vulgaris, Isaria densa natürlicher Feind. 322

Merulius lacrymans, Infektionsversuche mit Sporen und Mycel. 633

Methylazetat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648

Methylenblau, Eindringen in trockene Hefezellen. 302

—, Reduktion durch Leukocyten der Milch. 306

Micrococcus acidi lactis, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— — lactici, Vorkommen in schleimiger Milch. 263

— aurantiacus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— candicans, Vorkommen im Liptauer Käse. 492

— chromoflavus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— cremoides, Vorkommen im Liptauer Käse. 491

— freudenreichii, Vorkommen in mit Kleie verunreinigter Milch. 40

— lactis acidi, Vorkommen im Liptauer Käse. 490

— luteus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— nigrofaciens n. sp., Beschreibung. 325

— — — —, geographische Verbreitung. 335

Micrococcus nigrofaciens n. sp., Infektion von Periplaneta americana. 331

— — — —, Nachweis in erkrankten Lachnosterna-Larven. 328

— — — —, — — — Larven von Allorhina nitida. 332

— — — —, Pathogenität. 326

— pyogenes, Vorkommen im Liptauer Käse. 490

— radiatus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— rosettaceus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— roseus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— sulfureus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— umbilicatus, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

— versicolor, Vorkommen im Liptauer Käse. 517

Mikroorganismen, Giftbildung in Erdnußmehl. 93

Mikrothyriaceen, Membranstrukturen. 631

—, Systematik. 631

Milch, Alizarolprobe, Vergleich mit Alkoholprobe. 310

—, Alkoholreaktion, Wert. 308. 310

—, Ammoniakgehalt, Bedeutung und Bestimmung. 311

—, Bakteriengehalt der mit Maschine gemolkenen. 308

—, —, Veränderung durch Zusatz gärender Kleie. 38

—, —, — — — von Sesamkuchen. 201—212

—, —, — — — gärenden Sesammehls. 170—174. 176—179

—, —, Wirkung frischen Erdnußmehls. 106. 111. 124. 141. 146

—, —, — frischer Kleie. 35

—, —, — von frischem Sesammehl. 167. 174

—, —, — — gärendem Erdnußmehl. 109. 111. 131. 143. 147

—, —, — — Vorsichtsmaßregeln bei der Gewinnung. 263

—, Bibliographie des Jahres 1912. 262

—, biologische Untersuchung, Wert. 307

—, blaue durch Oidium. 267

—, Eiweiß-, Herstellung. 306

— euterkranker Kühe, Bestrafung bei Verkauf. 268

—, Fehler. 263. 267

—, Fermente. 246

—, Giftwirkung infolge Fütterung mit verdorbenem Erdnußmehl. 93

—, Handels-, Bakteriengehalt. 261

—, —, Vorkommen von Mastitis-Streptokokken. 261

—, keimarme, Herstellung nach dem Biorisatorverfahren. 305

—, kondensierte, Bakteriengehalt. 266

—, Larosan-, Säuglingsernährung. 268

Milch, Leukocyten, Reduktion von Methylenblau. 306
—, Reduktaseprobe, Verhalten der Leukocyten. 305
—, schleimige, Vorkommen von Chalara mycoderma. 263
—, —, — — Micrococcus acidi lactici. 263
—, Schleimkrankheit durch Bacillus mesentericus fuscus. 263
—, Steigerung der Produktion durch Sesamfütterung. 162
—, Streptokokkenuntersuchung. 264
—, Titration mit Alkohol verschiedener Konzentration. 309
—, Übertragung von Diphtherie. 268
—, — — Scharlach. 268
—, Verfälschung. 268
—, Versorgung großer Städte. 264
—, Vorkommen von Bacillus coli. 269
—, — — Bakterien. 32. 33. 104. 263. 269
—, — — Tuberkeln. 268
—, — — Typhusbazillen. 268
—, Wirkung der Bakterienflora von Kraftfuttermitteln. 1
—, Ziegen-, Verwendung als Kindermilch. 267
Milchdrüse, Fermente der laktierenden und nicht laktierenden. 246
—, Vorkommen von Amylase. 247
—, — — Guajakperoxydase. 247
—, — — Salolase. 247
Milchsäure, Bildung bei Kleiegärung. 20
Milchsäurebakterien s. Bakterien, Milchsäure-.
Milchwirtschaft, Bedeutung der Wiesen und Weiden. 268
Milchzucker, Essigsäurebildung durch Bacterium lactis aërogenes. 245
Milzbrand, Erreger, Vorkommen in Kleie. 80. 83. 84
Mist, Stall-, Kohlensäurebildung, Wirkung auf die Entwicklung der Pflanzen. 290
Mitrastemon yamamotoi, Schädling von Quercus cuspidata. 301
— —, Unterschied von Rafflesiaceen. 301
Monascus heterosporus, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
Most s. a. Wein.
—, Zusammensetzung, Wirkung des Frostes. 255
Mucor, Vorkommen in Erdnußmehl. 94
—, — — Kleie. 22
— racemosus, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
Mutterkorn, Vorkommen in Kleie. 19
Mycogyne, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
Mykologie, technische, Handbuch. 242

Nitrate, Bildung durch Bodenbakterien, antagonistische Wirkung von Anionen. 430
Nitrate, Bildung im Boden in verschiedenen Monaten. 585
—, — in kultiviertem und unbearbeitetem Boden. 451
—, Nachweis neben Nitrit und Ammoniak, Methode. 366
—, Reduktion durch Aktinomyceten. 676
—, — — Bakterien. 380
—, — zu Nitriten durch Aktinomyceten. 673
—, Wirkung auf die Gasbildung von Bacillus asterosporus. 423
Nitrite, Nachweis neben Nitrat und Ammoniak, Methode. 366
—, Speicherung durch Bakterien. 383
—, Wirkung auf die Gasbildung von Bacillus asterosporus. 423
Nutka-Cypresse s. Chamaecyparis nutkaensis.
Nysius senecionis, erstes Auftreten an Weinstöcken in Deutschland. 640
— —, Schädling von Senecio vulgaris. 640

Obstbäume, Beschädigung durch Xex. 239
—, Blattläuse, Bekämpfung mit Golaz. 239
—, rote Schildlaus, Bekämpfung mit Antiparassit. 239
—, Schädigung durch Orchestes fagi. 640
—, — — Otiorrhynchus singularis. 640
Öle, ätherische, Wirkung auf Bakterien. 548
—, —, — — Pflanzen. 548
Oidium, Blaufärbung von Milch. 267
—, Vorkommen in ranzigen Fetten. 92
— lactis, Vorkommen im Liptauer Käse. 485
Onikipilz, Bedeutung für Sojabereitung. 352
—, Vergleich mit Aspergillus ochraceus und A. melleus. 359—363
Onobrychis sativa, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Oospora lactis, Kohlenstoffnahrung aus der Luft. 647
Orchestes fagi, Schädling vom Apfelbaum. 640
— —, — — Kirschbaum. 640
Origanum creticum, Öl, Wirkung auf Bakterien. 549
Orleansverfahren zur Essigbereitung. 244
Ornithopus sativus s. a. Serradella.
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— —, Knöllchenbakterien, Impfung von Lupinus angustifolius und L. luteus. 472
Otiorrhynchus singularis, Schädling von Obstbäumen. 640

Pasteurisierung des Weines. 243
Penicillium, Fleckenbildung an Kautschuk. 297

Penicillium, Vorkommen in Kleie. 22
— glaucum, Verhalten gegenüber Weinsteinsäure. 297
— —, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
Periplaneta americana, Infektion mit Micrococcus nigrofaciens. 331
Pferde, Krüschkrankheit durch Kleie. 22
—, Schädigung durch Fütterung mit verdorbenem Erdnußmehl. 93
Pflanzen, Atmung, Untersuchung. 248
—, Einwirkung des Laub- und Nadelwaldes. 545
—, Mikrochemie. 301
—, Serologie. 302
—, Vorkommen von Karboxylase. 247
—, Wirkung ätherischer Öle. 548
Pflanzenreste, Zersetzung und Humifizierung, Bedeutung der Aktinomyceten. 659
Pflanzenschutz, gärtnerischer, Station in Dresden. 240
Pflaumenbäume, Blattläuse, Bekämpfung mit Golaz. 239
Pfirsichbaum, Kräuselkrankheit, Bekämpfung mit Schwefelkalkbrühe. 239
Phalacrus corruscus, Verbreitung von Weizensteinbrand. 638
Phaseolus vulgaris s. a. Bohne.
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Phonolith, Wirkung auf die Stickstoffsammlung im Boden. 291
Picea excelsa, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
Pilze, Farbstoffbildung. 654
—, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
—, Schimmel-, Beziehung zu benzoesauren Salzen der Gülle. 295
—, —, Bildung von Alkoholen aus Aminen. 245
—, —, — organischer Verbindungen im Boden. 276
—, —, chemische Veränderung von Getreidekörnern. 21
—, —, Kohlenstoffnahrung aus der Luft. 647
—, —, Vorkommen in Erdnußmehl. 94
—, —, — — ranzigen Fetten. 92
—, —, — — Katsuobushi. 352
—, —, — — Kleie. 21. 22
—, —, — von Karboxylase. 247
—, Vorkommen in Shoju-Moromi. 257
—, Wirkung ätherischer Öle. 549
Pilzgehalt von Waldboden in verschiedenen Tiefen. 277
Pilzgifte, Wirkung auf die Weingärung. 243
Pinus halepensis, Harz, Wirkung auf Bakterien. 550
— maritima, Verbesserung des Bodens. 546
— montana, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
— nigra, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
Piperidintartrat, Stickstoffquelle für Pilze und Hefen. 245
Pisum arvense, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— sativum s. a. Erbse.
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Polychrosis botrana s. a. Traubenwickler.
— —, Einschleppung nach Deutschland. 638
— —, Schädling vom Johannisbeerstrauch. 640
Pomeranzenschalen, Vorkommen von Carven. 555
Populus canadensis, Schädigung durch Exoascus aureus. 480
— nigra, Schädigung durch Exoascus aureus. 480
— siemonii, Schädigung durch Exoascus aureus. 480
— trichocarpa, Schädigung durch Exoascus aureus. 480
— —, — — Melampsora. 480
Porto Rico, Vorkommen des Junikäfers. 321
Propepton, Bildung durch Cladothrix chromogenes. 655
Propylazetat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Propyläther, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Propylalkohol, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Propylformiat, Assimilation durch Schimmelpilze. 648
Protococcus nivalis, Fleckenbildung an Kautschuk. 297
Protozoën, Vermehrung im Boden. 628
—, Vorkommen in verschiedenen Bodenarten. 625
Pseudomonas leuconitrophilus, Vorkommen im Boden. 276
— sesami, Vorkommen an Sesampflanze. 162
Pseudotsuga douglasii, Schädigung durch Caeoma pseudotsugae douglasii. 480
Pyrgota undata, natürlicher Feind von Lachnosterna. 322
Pyridinphosphat, Stickstoffquelle für Pilze und Hefen. 245

Quecksilberoxycyanid, bakterizide Wirkung. 233
Quercus s. a. Eiche.
—, Infektion mit Endothia gyrosa var. parasitica. 240
—, Infektionsversuche mit Endothia gyrosa. 240
—, Schädigung durch Diaporthe parasitica in Nordamerika. 240
— cuspidata, Schädigung durch Mitrastemon yamamotoi. 301

Rafflesia hasseltii, Biologie. 300

Rafflesia patma, Biologie. 300
— rochussenii, Biologie. 300
Raps, Wirkung von Terpentindämpfen. 557
Raupus, Bekämpfungsversuche gegen Blatt- und Blutläuse. 239
Reduktaseprobe der Milch, Verhalten der Leukocyten. 305
Rhodocapsa suspensa, Untersuchung. 258
Reis, Schalen, Vorkommen in Kleie. 19
Robinia pseudacacia, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Roggen, Bakterienflora der Körner, Veränderung bei trockener Aufbewahrung. 20
—, chemische Veränderung der Körner durch Schimmelpilze. 21
—, Keimlinge, Wirkung ätherischer Öle. 548
—, Keimpflanzen, bakteriologische Untersuchung. 22
Rose, Schädigung durch Junikäfer. 321
Rosmarinöl, Wirkung auf Bakterien. 549
Rotklee s. a. Trifolium pratense.
—, Knöllchenbakterien, Unverträglichkeit mit denen von Lupine bei Kalkmangel. 286
—, —, — — — — Serradella bei Kalkmangel. 286
Rübe, Schädigung durch Junikäfer. 321

Saccharobacillus pastorianus, Mannitbildung. 261
Saccharomyces cerevisiae s. a. Hefe.
— —, Sprossung, Wirkung des Lichtes. 340
— —, —, — von ultraviolettem Licht. 347. 349
— ellipsoideus, Wärmebildung. 251
— intermedius, Wärmebildung. 251
— logus, Wärmebildung. 251
— ludwigii, Sprossung, Wirkung des Lichtes. 341
— pastorianus, Wärmebildung. 251
— validus, Wärmebildung. 251
Saccharomyceten, Verhalten zu Inulin. 252
Säure, flüchtige, Bildung in zuckerfreien Weinen. 255
Sahne, Übertragung von Infektionskrankheiten. 268
Salolase, Vorkommen in Milchdrüsen. 247
Salpetrige Säure, quantitative Bestimmung. 375
Sammelmolkerei, Beziehung zur Unterernährung auf dem Lande. 267
Sand, Vorkommen in Kleie. 19
Sarcina, Vorkommen in Sesamkuchen. 215. 219. 220
—, — — Sesammehl. 182. 194. 196
— lutea, Vorkommen im Liptauer Käse. 517
— mobilis, Vorkommen in Erdnußkuchen. 158. 159
Satureja, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
Scharfwerden des Liptauer Käses, Unabhängigkeit vom Keimgehalt. 515
— — — —, Ursache. 483
Scharlach, Übertragung durch Milch. 268
Schildläuse, Bekämpfung mit Lysokreosol. 239
—, Bekämpfungsversuche mit Schwefelkalkbrühe. 239
Schildlaus, rote, Bekämpfung mit Antiparassit auf Birnbäumen. 239
—, Spritzversuche. 239
Schimmelpilze s. Pilze, Schimmel-.
Schistodepressaria nervosa, Bekämpfung. 233
— —, Biologie. 232
— —, Eulimneria costalis natürlicher Feind. 233
Schizoneura lanigera s. a. Blutläuse.
— —, Schädling von Cotoneaster horizontalis. 640
Schizosaccharomyces pombe, Wärmebildung. 251
Schlammsauger zur Gewinnung der Bodenmikroflora. 312
Schleimfluß der Bäume, Vorkommen von Essigbakterien. 244
Schleimkrankheit der Milch durch Bacillus mesentericus fuscus. 263
Schnitzel, Impfung mit Milchsäurebakterien. 298
Schwarzwerden des Weines. 243
Schwefel, Ventilato-, Bodenbehandlung gegen Kartoffelkrebs. 646
—, Wirkung auf das Wachstum von Hafer. 295
Schwefelkalkbrühe, Bekämpfungsmittel gegen Apfelmehltau. 239
—, — — Birnenmehltau. 239
—, — — Kräuselkrankheit des Pfirsichbaumes. 239
—, Bekämpfungsversuche gegen Fusicladium. 239
—, — — Schildläuse. 239
Schwefelwasserstoff, Bildung durch Chromatium. 258
—, — — Thiothrix. 258
—, Ursache des Böckser. 243
Schwein, natürlicher Feind von Lachnosterna. 322.
Serradella s. a. Ornithopus sativus.
—, Knöllchenbakterien, Unverträglichkeit mit denen von Rotklee bei Kalkmangel. 286
Sesamfütterung, Wirkung auf die Milchproduktion der Kühe. 162
Sesamkuchen, chemische Zusammensetzung. 162
—, Wirkung auf den Bakteriengehalt der Milch. 201—212
Sesammehl, Vorkommen von Bakterien. 164
—, frisches, Wirkung auf den Bakteriengehalt der Milch. 167. 174

Sesammehl, gärendes, Wirkung auf den Bakteriengehalt der Milch. 170—174. 176—179
Sesampflanze, Vorkommen von Bacillus sesami. 162
—, — — Pseudomonas sesami. 162
Shoju-Moromi, Bereitung, Bedeutung von Torula shoju. 257
— —, —, — — Torula shoju var. minuta. 257
— —, —, — — Torula turbinata. 257
— —, mykologische Untersuchung. 257
— hispida, Ausbleiben spontaner Knöllchenbildung. 479
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Sojahefe s. Hefe, Soja-.
Soja, Bereitung, Bedeutung des Onikipilzes. 352
—, — — Koji. 257
—, Hefe, Asporogenität. 364
Spargel, Schädigung durch Junikäfer. 321
Spirillum cholerae, Kultur auf verschiedenen Kartoffelnährböden. 303
Spondylocladium maculans, Fleckenbildungen an Kautschuk. 297
Stalldünger s. Dünger, Stall-.
Stallmist s. Mist, Stall-.
Staphylococcus pyogenes aureus, Vorkommen in kondensierter Milch. 267
Steinbrand des Weizens, Fütterungsversuche. 21
— — —, Bedeutung der Saatzeit für das Auftreten. 638
— — —, Verbreitung durch Phalacrus corruscus. 638
Sterilisierung des Weines. 243
Stickstoff, Bindung in kultiviertem und unbearbeiteten Boden. 453
—, — durch ein anaërobes Clostridium. 295
—, — im Boden in verschiedenen Monaten. 591
—, Festlegung im Boden durch Zeolithe. 282
—, Gründüngungs-, Verbleib im Sandboden. 287
—, Sammlung im Boden bei dauerndem Roggenbau. 279. 632
—, — — —, Wirkung von Phonolith und Kalktraß. 291
—, Umsetzungen im Boden, Untersuchungen. 577
Stickstoffkalk, Vergleich mit Chilisalpeter, schwefelsaurem Ammoniak und Kalkstickstoff. 294
Stickstoffverluste des Bodens. 281
Stoppelklee, Einsäuern mit Kartoffeln. 298
Streifenkrankheit der Gerste, Bedeutung der Saatzeit für das Auftreten. 638
Streptococcus lactis, Vorkommen im Liptauer Käse. 495
Streptothrix chromogena, Vorkommen in Sesamkuchen. 219
—, weiße, Vorkommen in Kleie. 84
Streptothrix, weiße, Vorkommen in Sesamkuchen. 199—201. 215. 218—220
— alba, Vorkommen in Sesammehl. 194. 197. 198
— chromogena, Vorkommen in Sesammehl. 194. 198
—, Vorkommen in Erdnußmehl. 99
Syncephalis, Fleckenbildung an Kautschuk. 297

Tabakpflanze, Vorkommen eines in Peroxydase übergehenden Zymogens. 297
Tee, Fermentation, Vorkommen von Hefen und Bakterien. 298
Terpentin, Wirkung auf den Bakteriengehalt des Bodens. 560
Terpentin, Wirkung der Dämpfe auf Impatiens sultani. 557
—, — — — — Lepidum sativum. 557
—, — — — — Raps. 557
—, — auf keimende Samen. 555
Terpentinöl, Wirkung der Dämpfe auf Pflanzen. 548
—, — auf Pilze. 549
Tetragonolobus purpureus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Thiothrix, Schwefelwasserstoffbildung. 258
Thuja occidentalis, Schädigung durch Fusarium. 638
Thymus, Öl, Wirkung auf Bakterien. 549
—, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
Torula, Vorkommen in Erdnußkuchen. 158. 159
—, — im Liptauer Käse. 513
—, — in Sesammehl. 164
—, Wärmebildung. 251
— shoju, Bedeutung für die Bereitung von Shoju Moromi. 257
— — var. minuta, Bedeutung für die Bereitung von Shoju Moromi. 257
— turbinata, Bedeutung für die Bereitung von Shoju Moromi. 257
Traubenwickler s. a. Polychrosis botrana.
—, Bedeutung der natürlichen Feinde. 639
Trifolium hybridum, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— incarnatum, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— pratense s. a. Rotklee.
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Trifolium repens, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Trigonella foenum graecum, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Trimethylamin, Bildung durch Bacterium fluorescens. 93
Trinkwasser s. Wasser, Trink-.
Tsuga canadensis, Vorkommen von Linksborneolazetat. 555
Tuberkeln, Vorkommen in Milch. 268
Typhusbazillen, Vorkommen in Milch. 268

Tyrosinase, Zusammensetzung aus zwei oxydierenden Enzymen. 248
Tyrosin-Kristalle, Abscheidung durch Cladothrix chromogenes. 655
Tyrosol, Bildung aus Hordenin durch Willia anomala. 245
Tyrothrix, Vorkommen in Liptauer Käse. 485

Ulex europaeus, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Umschlagen des Weines. 244
Unkraut, Samen, Vorkommen in Kleie. 19
Uredo chamaecyparidis nutkaensis n. sp., Schädling von Chamaecyparis nutkaensis. 480
Uviolmilch, Bakteriengehalt. 262

Veilchen, Schädigung durch Junikäfer. 321
Verticillium glaucum, Vorkommen auf Katsuobushi. 352
Vicia faba s. a. Bohne.
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— —, Keimlinge, Vorkommen von Karboxylase. 247
— —, Samen. Vorkommen von Karboxylase. 247
Vicia sativa, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
— villosa, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472
Vigna sinensis, Ausbleiben spontaner Knöllchenbildung. 479
— —, Impfung mit Knöllchenbakterien. 472

Wärme, Bildung durch Hefe. 251
Wasser, bakteriologische Untersuchung. 303
—, Brauerei-, Bedeutung seiner Zusammensetzung. 256
—, Trink-, Sterilisierung mit Chlorkalk. 313. 635
Weichkäse s. Käse, Weich-.
Wasserhaushalt des Bodens, Bedeutung der Gründüngung. 289
Wein s. a. Most.
—, Abziehen und Klären. 243
—, alter, Vorkommen von gärfähiger Hefe. 243
—, Böckser, Ursache. 243
—, Buttersäurestich. 244
—, Fehler. 243
—, Gärung, Wirkung von Pilzgiften. 243
—, Geschmacksänderung durch Schimmelpilze. 243
—, Haupt- und Nachgärung. 243
—, Mäuseln. 244
—, Mannitgärung. 244
—, Pasteurisierung und Sterilisierung. 243
—, zuckerfreie, Bildung flüchtiger Säure. 255
Wein, Zusammensetzung, Wirkung des Frostes. 255
Weingärung s. Gärung, Wein-.
Weinsteinsäure, Verhalten von Aspergillus niger. 297
—, — — Penicillium glaucum. 297
Weinstock, Schädigung durch Junikäfer. 321
—, — — durch Nysius senecionis an Weinstöcken. 640
Weizen, Bakterienflora der Körner, Veränderung bei trockener Aufbewahrung. 20
—, chemische Veränderung der Körner durch Schimmelpilze. 21
—, Flugbrand, Bedeutung der Saatzeit für das Auftreten. 638
—, —, Bekämpfung mit Heißwasser. 637
—, Keimfähigkeit, Bedeutung der Aussaatzeit im Vorjahre. 638
—, Keimlinge, Alkoholbildung. 253
—, —, Atmung lebender und getöteter. 248. 250
—, —, Vorkommen von Karboxylase. 247
—, Keimpflanzen, bakteriologische Untersuchung. 22
—, Körner, Vorkommen von Karboxylase. 247
—, Steinbrand, Bedeutung der Saatzeit für das Auftreten. 638
—, —, Fütterungsversuche. 21
—, —, Verbreitung durch Phalacrus corruscus. 638
Willia anomala, Bildung von Glykolsäure aus Betaïn. 245
— —, — — Tyrosol aus Hordenin. 245

Xex, Bekämpfungsmittel gegen Blattläuse. 239
—, Beschädigung von Birnbäumen. 239

Yoghurt, Herstellung. 270
—, Trockenpräparate, Fehlen von Bacillus bulgaricus. 270

Zähwerden des Weines. 244
Zellulose, Vergärung bei verschiedenen Stickstoffquellen. 296
—, Zersetzung durch Aktinomyceten. 673
—, Zerstörung durch Actinomyces alboroseus. 296
Zeolithe, Festlegung des Stickstoffs im Boden. 282
Ziegenmilch, Verwendung als Kindermilch. 267
Zierpflanzen, Schädigung durch Junikäfer. 321
Zucker, Vergärung verschiedener Arten durch Lactobacillus fermentum. 259
Zuckerarten, gärfähige, Assimilation durch Hefe. 253
Zuckerrohr, Schädigung durch Junikäfer. 321
Zuckerrübe, Ertragssteigerung durch Kochsalzdüngung. 290

III. Verzeichnis der Abbildungen.

Actinomyces, Agarkolonie (Fig. 1). 660
—, Luftsporen (Fig. 2 u. 3). 660. 661
— albosporeus, Kultur (Taf. II, Fig. 2 b, 4 f.). 688
— albus, Kultur (Taf. II, Fig. 4 a). 688
— cellulosae, Kultur (Taf. I, Fig. 4; Taf. II, Fig. 3 e). 688
— citreus, Kultur. 688
— diastaticus, Kultur (Taf. I, Fig. 1; Taf. II, Fig. 3 c). 688
— diastatochromogenes, Kultur (Taf. II, Fig. 4 b). 688
— erythrochromogenes, Kultur (Taf. II, Fig. 3 a). 688
— flavochromogenes, Kultur (Taf. II, Fig. 1 a). 688
— flavus, Kultur (Taf. II, Fig. 1 b). 688
— griseoflavus, Kultur (Taf. II, Fig. 4 c). 688
— griseus, Kultur (Taf. I, Fig. 3; Taf. II, Fig. 3 c). 688
— melanosporeus, Kultur (Taf. II, Fig. 2c). 688
— microflavus, Kultur (Fig. 4). 661
— —, — (Taf. II, Fig. 1 d). 688
— parvus, Kultur (Taf. I, Fig. 2; Taf. II, Fig. 1 c). 688
— roseus, Kultur (Taf. II, Fig. 3 d). 688
— ruber, Kultur (Taf. II, Fig. 1 e; 2 d, 4 d). 688
— viridochromogenes, Kultur (Taf. II, Fig. 2 a). 688
Allorhina nitida, Gewebe mit Micrococcus nigrofaciens (Taf. III, Fig. 8—9; Taf. IV, Fig. 10—11). 339
Apparat zur Ammoniakbestimmung. 378
— — Gewinnung gasfreier Kohle. 464
— — sterilen Gewinnung von Kohle. 461
— — Untersuchung von Mikroorganismen in verschiedenfarbigem Licht. 345
Bacillus petasites, Wachstum, Verhältnis zum verkrauchten KNO_3 (Fig. 10). 419
Bacillus subtilis, Wachstum, Verhältnis zur Ammoniakspeicherung (Fig. 6). 416
— —, —, — — Nitratzersetzung. 417
— —, —, — — Nitritspeicherung (Fig. 5) 416
— tumescens, Wachstum, Verhältnis zur Ammoniakspeicherung (Fig. 9). 418
— —, —, — zum verbrauchten KNO_3 (Fig. 8). 418
Bakterien, Boden-, Nitratbildung, Wirkung von Anionen, Antagonismus (Fig. 1—6). 432. 434. 435. 437. 439. 441
—, Stickstoffbindung in Böden mit verschiedenem Wassergehalt (Kurven). 624
Buchweizen in Buchen- und Fichtenhumus. (Taf. I). 572
Fichtennadeln, Schädigung von Mais (Taf. IV). 573
Impatiens sultani, Schädigung durch Terpentindämpfe (Taf. II). 572
Käse, Liptauer, Bakteriengehalt, Abnahme (Kurve). 514
Kohle, Absorptionskraft (Fig. 3 u. 4). 468
Kolorimeter nach Autenrieth. 373
— — Donnan. 376
Kresse, Schädigung durch Carven und Terpentindampf (Taf. III). 572
Lachnosterna, Larve (Fig. 1). 323
—, —, Haar (Taf. I, Fig. 5). 339
—, —, mit Micrococcus nigrofaciens infiziertes Gewebe (Taf. II, Fig. 6 u. 7). 339
—, —, infiziert mit Micrococcus nigrofaciens (Fig. 2). 323
Mais, Schädigung durch Zusatz von Fichtennadeln zum Boden (Taf. IV). 573
Micrococcus nigrofaciens n. sp., Kulturen (Taf. I, Fig. 1—4). 339
Periplaneta americana, Infektion mit Micrococcus nigrofaciens. 331
Raps, Schädigung durch Carven und Terpentindampf (Taf. III). 572
Sojahefe, Kultur (Taf. I, Fig. 1—4). 365

IV. Neue Literatur.

314

Hofbuchdruckerei Rudolstadt

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Seit April 1913 erscheint:

Die Süßwasser-Flora

Deutschlands, Österreichs und der Schweiz

Bearbeitet von

Prof. Dr. **G. Beck, R. v. Mannagetta und Lerchenau** (Prag), Dr. **O. Borge** (Stockholm), **J. Brunnthaler** (Wien), Dr. **W. Heering** (Hamburg), Prof. Dr. **R. Kolkwitz** (Berlin), Dr. **E. Lemmermann** (Bremen), Dr. **J. Lütkemüller** (Baden bei Wien), **W. Mönkemeyer** (Leipzig), Prof. Dr. **W. Migula** (Eisenach), Dr. **M. v. Minden** (Hamburg), Prof. Dr. **A. Pascher** (Prag), Prof. Dr. **V. Schiffner** (Wien), Prof. Dr. **A. J. Schilling** (Darmstadt), **H. v. Schönfeldt** (Eisenach), **C. H. Warnstorf** (Friedenau bei Berlin), Prof. Dr. **J. N. F. Wille** (Christiania), Kustos Dr. **A. Zahlbruckner** (Wien).

Herausgegeben von
Prof. Dr. **A. Pascher** (Prag).

Einteilung:

*) Heft 1: **Flagellatae I.** Allgemeiner Teil von A. Pascher; *Pantostomatinae*, *Protomastiginae*, *Distomatinae* von E. Lemmermann. Mit 252 Abbildungen im Text. (IV, 138 S.) 1914. Preis: 3 Mark 50 Pf., geb. 4 Mark.

*) Heft 2: **Flagellatae II.** *Chrysomonadinae*, *Cryptomonadinae*, *Eugleninae*, *Chloromonadinae und gefärbte Flagellaten unsicherer Stellung.* Von A. Pascher und E. Lemmermann. Mit 398 Abbildungen im Text. (IV, 192 S.) 1913. Preis: 5 Mark, geb. 5 Mark 50 Pf.

*) Heft 3: **Dinoflagellatae (Peridineae)** (*Flagellatae III*). Von A. J. Schilling. Mit 69 Abbildungen im Text. (IV, 66 S.) 1913. Preis: 1 Mark 80 Pf., geb. 2 Mark 30 Pf.

Heft 4: **Volvocales** (*Flagellatae IV*) mit dem allgemeinen Teile der *Chlorophyceae*, (*Chlorophyceae I.*) Von A. Pascher.

Heft 5: **Tetrasporales, Protococcales.** (*Chlorophyceae II.*) Von E. Lemmermann und J. Brunnthaler.

*) Heft 6: **Chlorophyceae III.** (*Ulotrichales*, *Microsporales*, *Oedogoniales.*) Von W. Heering, Hamburg. Mit 385 Abbildungen im Text. (IV, 250 S.) 1914. Preis: 6 Mark, geb. 6 Mark 60 Pf.

Heft 7: **Siphonales, Siphonogladiales** (*Chlorophyceae IV*). Von W. Heering.

Heft 8: **Desmidiaceae.** Von J. Lütkemüller.

*) Heft 9: **Zygnemales.** Von O. Borge und A. Pascher. Mit 89 Abbildungen im Text. (IV, 51 S.) 1913. Preis: 1 Mark 50 Pf., geb. 2 Mark.

*) Heft 10: **Bacillariales (Diatomeae).** Von H. v. Schönfeldt. Mit 379 Abbildungen im Text. (IV, 187 S.) 1913. Preis: 4 Mark, geb. 4 Mark 50 Pf.

Heft 11: **Heterokontae, Phaeophyceae, Rhodophyceae.** Von W. Herring. — **Charales.** Von W. Migula.

Heft 12: **Schizophyceae.** Von F. N. Wille.

Heft 13: **Schizomycetes.** Von R. Kolkwitz. — **Fungi.** Von M. von Minden. — **Lichenes.** Von A. Zahlbruckner.

*) Heft 14: **Bryophyta** (*Sphagnales*, *Bryales*, *Hepaticae*). Von C. H. Warnstorf, W. Mönkemeyer, V. Schiffner. Mit 500 Abbildungen im Text. (IV, 222 S.) 1914. Preis: 5 Mark 60 Pf., geb. 6 Mark 20 Pf.

Heft 15: **Pteridophyta, Anthophyta.** Von G. von Beck.

Heft 16: **Phytoplankton.** Von A. Pascher.

Die mit *) versehenen Hefte sind bereits erschienen.

Fortsetzung auf nächster Seite.

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Die Süßwasser-Flora erscheint gewissermaßen als **Gegenstück zur Süßwasserfauna** (herausgegeben von A. Brauer) und auch in ihrem Kleide. Die Süßwasser-Flora geht aber weit über den Rahmen der Süßwasserfauna hinaus: sie umfaßt Deutschland, Österreich und die Schweiz und behandelt auch viele Formen der anstoßenden Randgebiete. Damit ist der Benutzer in den Stand gesetzt, nicht nur Wiederholungs-, sondern auch Neubeobachtungen zu machen und damit auch seine floristische Kenntnis zu erweitern. Großes Gewicht wurde ferner auch gelegt auf die Betonung ungeklärter Formen, strittiger Fragen in bezug auf Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaft, sowie auf Hinweise auf Lücken in unserem Wissen über die einzelnen Hydrophyten. Dadurch wieder kann der Benutzer glückliche Zufälle in der Erlangung geeigneten Materials, und wie sehr ist jeder besonders bei den Niederen auf derartige glückliche Zufälle angewiesen, auch zur Vervollständigung unseres Wissens verwenden.

Als ein besonderer Vorzug der Süßwasser-Flora ist die ausgiebige Beigabe von Textfiguren zu bezeichnen. Es wurden soweit als **möglich alle Arten in einfachen Textfiguren abgebildet**, die speziell die für das Erkennen wichtigen Details klar wiedergeben. Ein großer Teil dieser Figuren sind Originalzeichnungen, oft nach Originalpräparaten gefertigt — dies trifft besonders zu für die Desmidiaceae, Peridineae, Chrysomonaden, die Moose spez. Sphagnales und Bryales usw. — **Mit ihren weit über 7000 Textfiguren (und annähernd 10000 Einzelfiguren) läßt die Süßwasser-Flora alle bisher erschienenen einschlägigen Werke weit hinter sich. — Die „Süßwasser-Flora" stellt den ersten Versuch dar, die Gesamtheit der heimischen Süßwasserorganismen in Wort und Bild, sowie in kritischer, wissenschaftlich völlig auf der Höhe stehender Weise, darzustellen.**

Trotzdem eine derart ausgiebige figürliche Darstellung das Erkennen der Arten ungemein erleichtert, **wurde großes Gewicht gelegt auf die Abfassung klarer Bestimmungsschlüssel, die leicht und sicher zur Erkennung der Art führen sollen.** Der Umstand, daß die einzelnen Gruppen nur von den besten Kennern bearbeitet wurden, hat auch hier über Schwierigkeiten in der Darstellung hinweggeholfen, die immer in den Fällen auftreten, in denen es sich um rein kompilatorische Darstellung einer Disziplin durch einen Nichtfachmann handelt. Das Prinzip einheitlich gemachter Bestimmungsschlüssel wurde ruhig in den Fällen durchbrochen, wo die Eigenart einer Gruppe einen anderen Modus für praktischer erscheinen ließ: das Hauptgewicht wurde immer auf Klarheit und Sicherheit bei der Benutzung gelegt. — Daß es dabei gelang, die einzelnen Arten und Gattungen in einer Reihenfolge zu behandeln, die unseren derzeitigen Anschauungen über die Verwandtschaftsverhältnisse möglichst entspricht, erhebt die Süßwasser-Flora weit über eine zum bloßen Bestimmen dienende Exkursionsflora.

Im allgemeinen wurde das vorausgesetzt, was die gebräuchlicheren Lehrbücher der Botanik (Bonner Lehrbuch, Giesenhagen, Prantl-Pax, Chodat u. a.) bringen. Gleichwohl erschien es **im Interesse von Anfängern** für angezeigt, **der speziellen Behandlung jeder einzelnen größeren Gruppe noch einen allgemeinen Teil vorauszuschicken, der das Wichtigste aus der Morphologie, Entwicklungsgeschichte, der Biologie, den Untersuchungs-, Kultur- und Präpariermethoden enthält.**

Betont sei ferner, daß die vorliegende Bearbeitung großenteils keine bloße Kompilation wie es viele der in letzter Zeit speziell über die niederen Pflanzen erschienenen Florenwerke darstellt. Viele Gruppen erfuhren, manche das erstemal, überhaupt eine kritische Durcharbeitung, es sei hier nur auf die Chryso- und Cryptomonaden, die Peridineen und andere Flagellaten, die Volvocales, Protococcales, die Ulotrichales, Desmidiaceae, Cyanophyceae und viele andere Familien verwiesen, kritische Bearbeitungen, die sich wohl mehr dem Fachmann als solche darbieten.

Das Heft Phytoplankton ist hauptsächlich für jene Hydrobiologen gedacht, die, ohne Botaniker von Fach zu sein, sich in diesem Heft leicht, ohne sich erst durch die ungeheuere Zahl der Süßwasserformen durcharbeiten zu müssen, über die planktonischen Formen orientieren können.

Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz erscheint in Taschenformat in 16 einzelnen, selbständigen Heften, die völlig geschlossene Gruppen behandeln. Bis Mitte 1915 wird das Werk abgeschlossen sein. — Illustrierter Prospekt kostenfrei.

Jedes Heft ist einzeln käuflich.

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

AN INITIAL FINE OF 25 CENTS
WILL BE ASSESSED FOR FAILURE TO RETURN THIS BOOK ON THE DATE DUE. THE PENALTY WILL INCREASE TO 50 CENTS ON THE FOURTH DAY AND TO $1.00 ON THE SEVENTH DAY OVERDUE.

Book Slip—10m-8,'51 (6813s4) 458

81926
Zen. f. bakt.

QR1
Z4
Abt.2
v.41

Zen.

QR1
Z4
Abt.2
v.41

81926